

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. P. Griss

Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik
Leiter: Prof. Dr. D.B. Jones

Die Auswirkung von Schwerelosigkeit auf die Genexpression in primären bovinen Osteoblasten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Simone Biermann

aus Stuttgart

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
am 23.05.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold

Referent: Prof. Dr. D.B. Jones

Korreferent: Prof. Dr. M. Koch

1. Einleitung	1
1.1. Knochen als mechanorezeptorisches Gewebe	1
1.1.1. Kopplung zwischen Knochenresorption und –synthese	2
1.1.2. Das mechanosensorische System im Knochen	4
1.1.2.1. Mechanosensorische Knochenzellen: Osteoblasten und Osteozyten	5
1.2. Mechanotransduktion	6
1.2.1. Perzeption mechanischer Stimuli	6
1.2.1.1. Strömungspotentiale	7
1.2.1.2. Mechanosensitive Ionenkanäle	7
1.2.1.3. Mechanotransduktion mit Beteiligung des Zytoskeletts	8
1.2.1.4. Die Rolle des Ziliums	8
1.2.2. Zelluläre Transduktionsmechanismen	8
1.3. Experimentelle Ansätze zur Untersuchung des Einflusses von Schwerelosigkeit und mechanischer Entlastung auf den Knochen	10
1.3.1. Experimente in vivo	11
1.3.2. Experimente in vitro	12
1.4. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.1.1. Lösungen und Puffer	15
2.1.2. Längenstandards	16
2.1.3. Oligonukleotide	16
2.1.4. Bakterienstämme	17
2.1.5. Primärzellen	17
2.1.6. Plasmide	17
2.1.7. Nährmedien	17
2.1.8. Geräte und verwendete Materialien	18
2.1.9. Chemikalien	19
2.2. Zellkultur	20
2.2.1. Arbeiten mit Zellkulturen	20
2.2.2. Präparation von primären bovinen Osteoblasten	20
2.2.3. Kryokonservierung	21
2.2.4. Spezielle Kulturbedälter	22
2.2.4.1. Zelldehnungsschalen	22
2.2.4.2. Zentrifugenschalen	22

2.3. Experimente mit primären bovinen Osteoblasten	23
2.3.1. Das Parabelflugexperiment	23
2.3.1.1. Influg Kontrollexperiment	25
2.3.2. Kontrollexperimente im Labor	27
2.3.2.1. Kontrollzentrifugation bei 1,8g	27
2.3.2.2. Dehnungsexperiment mit der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine	27
2.3.2.3. Dehnungskontrollexperiment	29
2.4. Molekularbiologische Methoden	30
2.4.1. RNA-Isolierung aus Zellkulturen	30
2.4.1.1. Isolierung der Gesamt-RNA	30
2.4.1.2. Entfernung genomischer DNA aus RNA-Präparationen	31
2.4.2. Photometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung	32
2.4.3. Elektrophoresetechniken	32
2.4.3.1. RNA-Agarose-Gelelektrophorese	32
2.4.3.2. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	33
2.4.3.3. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
2.4.4. Differential-Display Technik	34
2.4.4.1. Reverse Transkription	37
2.4.4.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.4.4.3. Polyacrylamidgelelektrophorese zur Darstellung der PCR-Produkte	39
2.4.4.4. Isolierung von differierenden Banden und Reamplifizierung	40
2.4.4.5. Subklonierung und weitere Vorgehensweise	41
2.4.5. Ligation und Klonierung von PCR-Produkten	42
2.4.6. Bakterienkulturen	42
2.4.6.1. Präparation transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	42
2.4.6.2. Transformation kompetenter <i>E.coli</i> und anschließende Selektion	43
2.4.7. Plasmid-Minipräparationen	45
2.4.7.1. Restriktion	46
2.4.8. Northern Blot Analyse	46
2.4.8.1. Radioaktive Markierung von DNA	47
2.4.8.2. Aufreinigung von Sonden	48
2.4.8.3. DNA-RNA-Hybridisierungen	48
2.4.9. Reverse Northern Analyse	49
2.4.9.1. Dot Blotting	50
2.4.9.2. Dot Blot Hybridisierung	52
2.4.10. Sequenzierung	53
3. Ergebnisse	54

3.1. Arbeitsverlauf	54
3.2. Analyse der Genexpression	55
3.2.1. RNA-Isolation und Qualitätskontrolle	55
3.2.2. Differential Display	56
3.2.3. Differential Display Analyse	57
3.2.4. Isolierung und Reamplifizierung von differierenden Fragmenten	63
3.2.5. Subklonierung, Transformation und Minipräparation	64
3.2.6. Reverse Northern Analyse	67
3.2.7. Northern Blot Analyse	71
3.2.8. Sequenzierungen	72
4. Diskussion	77
4.1. Methodische Aspekte	78
4.1.1. Differential Display: Analyse differentieller Genexpression	78
4.1.2. Reverse Northern Analyse	79
4.1.3. Northern Blot Analyse	80
4.1.4. Sequenzierung	80
4.2. Bewertung der Ergebnisse	82
5. Zusammenfassung	89
6. Literaturverzeichnis	91
7. Anhang	103
7.1. Abkürzungen	103
7.2. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	105
7.3. Danksagung	106
7.4. Ehrenwörtliche Erklärung	107

1. Einleitung

Knochen ist ein plastisches, dynamisches Gewebe, das ständig unter hormoneller Kontrolle adaptiv auf sein mechanisches Umfeld mit einer Synthese von Knochenmatrix bei Belastung und mit degradativen Prozessen bei mechanischer Entlastung reagiert. Es ist bekannt, daß physikalisch aktive Menschen eine erhöhte Knochenmasse besitzen (*Smith und Gilligan, 1990*). Dagegen führt eine andauernde Entlastung durch Immobilisierung und Bettlägrigkeit zu Knochenverlusten und erhöhter Frakturgefährdung. Bei Astronauten, die längerer Zeit der Schwerelosigkeit ausgesetzt sind, findet sich ebenso ein erheblicher Verlust der Knochendichte (*Rambaut und Johnston, 1979*). Über den zugrundeliegenden Mechanismus, der letztendlich zu einem Verlust an Knochenmasse unter schwerelosen Bedingungen führt, gibt es verschiedene Hypothesen, eine allgemein anerkannte Theorie existiert zur Zeit jedoch noch nicht (*siehe Übersichtsartikel von Marie et al, 2000*).

In der vorliegenden Arbeit wird die Auswirkung kurzfristiger Phasen von Schwerelosigkeit auf primäre bovine Osteoblasten durch eine Analyse der Genexpression untersucht.

1.1. Knochen als mechanorezeptorisches Gewebe

Knochengewebe ist das skelettbildende, stützende Bindegewebe der Wirbeltiere. Der Knochen erfüllt zwei grundlegende Aufgaben: Er dient als Reservoir für Mineralien und stellt das strukturelle Gerüst des Körpergewichts und der Muskeln dar.

Vor mehr als einem Jahrhundert publizierte der Berliner Chirurg Julius Wolff in seinem Buch ‚Das Gesetz der Transformation der Knochen‘, daß die Architektur des Knochens einem trajektoriellen Bauprinzip entspricht (*Wolff, 1892*). Wolff ging davon aus, daß statische Kräfte die Form und somit die Funktion des Knochens bestimmen, eine Resorption hielt er für

unmöglich. Die Theorie ist gewissermaßen anerkannt, jedoch in seiner ursprünglichen Fassung nicht mehr gültig. Heute geht man davon aus, daß der Knochen durch das „bone remodeling“ der mechanischen Belastung angepasst wird, ein durch Wilhelm Roux geprägter Begriff (*Roux, 1881*). Demnach finden nach Abschluß des Knochenwachstums fortwährend Umbauvorgänge statt, die in einer lokalen Auflösung von Knochensubstanz und dem Ersatz mit neugebildeter Knochenmatrix bestehen. Bei Belastung verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Knochendegradation und Produktion zugunsten der Knochenproduktion.

1.1.1. Kopplung zwischen Knochenresorption und –synthese

Der Prozess von anabolischen und katabolischen Vorgängen im Gewebe wird durch die mechanische Belastung reguliert im Zusammenhang mit lokalen und systemischen Hormonen um sicherzustellen, daß das Gewebe auf die Forderung der mechanischen Umgebung eingehen kann (*Jones et al, 1995*).

Eine biomechanische Kopplung von Knochenresorption und –synthese wird von Frost und Rodan beschrieben (*Frost, 1987; Rodan, 1996; Rodan, 1991*).

Disuse Window	Physiological Window	Overuse Window	Pathological Overload Window
Resorption>Formation	Resorption=Formation	Resorption<Formation	Woven bone formation
Increased remodeling	Homeostasis	Increased modeling	
	50-200 μ str	1500-2500 μ str	4000-5000 μ str

Abbildung 1.1.1-1 Mechanostat-Theorie nach Frost (1987), modifiziert nach Rubin und Lanyon (1985).

Nach der Mechanostat-Theorie von Frost erfolgt eine Differenzierung der mechanischen Belastung in vier Bereiche bzw. Fenster (Frost, 1987). Jedes Fenster ist vom anderen über eine minimal effektive Belastung (MES=minimal effective strain) getrennt. Der Begriff „Strain“ bezeichnet die durch Dehnung hervorgerufene mechanische Belastung und ist definiert als Längenänderung pro Längeneinheit, wobei 1 strain einer Längenänderung von 100 % entspricht.

Im Bereich des „Disuse Window“ ist die mechanische Belastung (=strain) gering und bei aktiven Umbauvorgängen wird Knochensubstanz netto abgebaut. „Physiological Window“: Bei Belastungsstärken von 1500-2000 μ strain herrscht eine ausgeglichene Bilanz zwischen Knochenresorption und Synthese. Eine positive Knochenbilanz mit erhöhter Syntheseleistung charakterisiert das „Overuse Window“. Im „Pathological Overuse Window“ wird lamellärer Knochen auf der Knochenoberfläche produziert.

Frost differenziert so zwischen Auf- und Umbauprozessen, die durch distinkte Schwellenwerte zur Aktivierung der Knochensynthese voneinander getrennt sind. Demnach kommt es zu einer positiven Knochensynthesebilanz, wenn der Knochen lokal mechanische Signale erfährt, die einen Schwellenwert zum physiologischen „Fenster“ überschreiten (siehe Abbildung 1.1.1-1). Dadurch verändert der Knochen seine Struktur und reduziert den Effekt der lokal wirkenden Dehnung unterhalb der minimal wirkenden effektiven Belastung (MES).

In diesem rigiden Modell bleiben jedoch Frequenz und Zahl der Belastungszyklen unberücksichtigt. Qin et al konnten beispielsweise in in vivo-Experimenten mit Ulnae des Hühnchens eine minimal effektive Belastung von 70 μ strain bei 100.000 Zyklen und 30 Hz detektieren, die für einen Zuwachs der Knochensubstanz notwendig ist (Qin et al, 1998).

Rodan weitete das Modell aus und erklärte mit Hilfe der Mechanostat-Theorie eine Kopplung von Knochenresorption und –synthese (Rodan, 1996; Rodan, 1991). Wird ein Knochenresorptionsprozess durch eine Verminderung der mechanischen Belastung oder durch ein

Calciummobilisierungssignal ausgelöst, so wird dieser Prozess solange aufrechterhalten, bis ein derzeit unbekanntes Signal ihn stoppt. Ein nun dünnerer Trabekel würde bei gleicher auf den Knochen ausgeübter mechanischer Belastung eine stärkere Deformation erfahren. Solange die synthetisierenden Osteoblasten die erhöhte Belastung erfahren würden, wäre eine lokale Knochensynthese die Folge. Dieses Modell würde damit die Resorption von mechanisch unbelastetem Knochen und die trajektorielle Adaptation der Trabekelarchitektur erklären. Vertikal verlaufende Trabekel sind bei der Knochenresorption stark konserviert.

Hinsichtlich der Pathogenese der Osteoporose vermutet Frost eine Verschiebung der minimal effektiven Belastungsstärken. Ein hypothetischer Sensor würde bei erniedrigter Östrogenkonzentration eine geringere mechanische Belastung signalisieren und in der Folge eine Knochenresorption verursachen.

1.1.2. Das mechanosensorische System im Knochen

Knochen ist ein spezialisiertes Bindegewebe, bestehend aus Kollagenfibrillen (Typ I), Calciumphosphat (Hydroxylapatit), verschiedenen Mineralien und extrazellulären, nicht-kollagenen Matrixproteinen.

Osteoblasten leiten sich von Knochenvorläuferzellen ab und synthetisieren den organischen Bestandteil der Knochenmatrix (Osteoid), die aus Typ-I-Kollagen sowie aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen besteht. Von den Osteoblasten frisch gebildetes Osteoid wird durch die Einlagerung von Calciumphosphatkristallen in harte Knochensubstanz überführt.

Den häufigsten Zelltyp im Knochen stellen die *Osteozyten* dar. Sie differenzieren sich aus Osteoblasten, nachdem diese von der neu gebildeten Interzellulärsubstanz umgeben wurden. Benachbarte Osteozyten können miteinander durch lange Zytoplasmafortsätze miteinander kommunizieren, die sich in feinen Kanälchen, den Canaliculi, erstrecken. Diese Zellen pro-

duzieren keine Matrixproteine mehr, sind nicht mehr teilungsfähig und haben gegenüber den Osteoblasten einen Großteil ihres Golgi-Apparates und endoplasmatischen Retikulums verloren. Osteozyten stehen untereinander und mit den Osteoblasten über gap junctions in Verbindung und bilden ein funktionelles Synzythium (*Doty, 1981*).

Osteoklasten entstehen durch Fusion von mononukleären Vorläufern und sind für die Knochenresorption verantwortlich. Diese vielkernigen Riesenzellen scheiden Säuren und Hydrolasen aus und tragen so zur Bildung sogenannter Resorptionsmulden und –kanäle bei.

1.1.2.1. Mechanosensorische Knochenzellen: Osteoblasten und Osteozyten

Im erwachsenen Knochen machen aktive Osteoblasten nur 5% der Knochenoberfläche aus, die weitaus größte Oberfläche (94%) ist mit sogenannten „bone lining cells“, osteozytenähnlichen Zellen bedeckt (*Parfitt 1983*). Bedingt durch den geringen Anteil der Osteoblasten argumentieren Duncan und Aarden (*Duncan und Turner, 1995; Aarden et al, 1994*), daß Osteozyten die funktionelle Adaptation des Knochens auf mechanische Belastungen vermitteln. Diese Zellen reagieren auf mechanische Belastung in vivo (*Dodds et al, 1993*) und sind untereinander und mit anderen Knochenzellen über gap junctions verbunden. Sie sind jedoch nicht teilungsfähig und besitzen einen stark reduzierten Stoffwechsel. Daher scheint eine Kommunikation zwischen nichtproliferierenden, mechanosensiblen Zellen und aktiven Osteoblasten über parakrine Faktoren wahrscheinlich. Eine Unterstützung der Hypothese, daß Osteozyten über eine interzelluläre Kommunikation den Knochenumbau (zumindest teilweise) steuern können, ist durch eine Arbeit von Lean et al gegeben worden (*Lean et al, 1995*). Es wurde gezeigt, daß einer Expression von Insulin-like Growth Factor (IGF-1) 6 Stunden nach mechanischer Belastung eines Rattenknochens in Osteozyten eine Kollagen- und Osteocalcinexpression 48 Stunden nach Belastung an der Knochenoberfläche folgt.

Die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Zelltypen allein kann aber nicht als Argument gelten, daß Osteozyten primär mechanosensorische Aufgaben erfüllen, während Osteoblasten als Empfängerzellen Signale der Osteozyten zur Durchführung ihrer Aufgaben erhalten.

In einer Vielzahl von Experimenten konnte gezeigt werden, daß Osteoblasten ebenso wie Osteozyten eine erhöhte Sensitivität gegenüber mechanischer Belastung aufweisen. In vitro führt eine mechanische Stimulation von Zellen generell zu einer erhöhten Proliferationsrate (*Jones und Schoelbbers, 1988; Jones et al, 1991; Burger und Veldhuijzen, 1993; Vandenburg et al, 1989*).

1.2. Mechanotransduktion

Unter Signaltransduktion versteht man einen Vorgang, bei dem ein extrazellulärer Stimulus eine physiologische Antwort hervorruft. Ist dieser Stimulus ein mechanischer Reiz, nennt man dies Mechanotransduktion, ein ubiquitäres Phänomen. Prokaryonten und Eukaryonten können so auf ihr mechanisches Umfeld, z.B. Wind, Vibrationen und Gravitation reagieren (*Wehner und Gehring, 1995*). Bei Knochenzellen findet schon bei typischen zellulären Deformationen - im Bereich von 0,3 % Längenänderung - eine Transduktion in biochemische Signale statt, wohingegen bei Muskelzellen die adäquate Belastung bei bis zu 150 % liegt. Der Knochen ist also ein gegenüber mechanischen Deformationen sehr empfindliches Gewebe.

1.2.1. Perzeption mechanischer Stimuli

Es gibt verschiedene Theorien über die Wahrnehmung von mechanischer Stimulation durch den Osteoblasten, die nachfolgend erläutert werden.

1.2.1.1. Strömungspotentiale

Strömungspotentiale als Modell für einen physiologischen Regulationsmechanismus der Knochenadaptation wurden erstmals von Basset und Becker propagiert (*Basset und Becker, 1962; Basset, 1968*).

Demnach entsteht eine Strömung interstitieller Flüssigkeit im Knochen als Ergebnis einer mechanischen Deformation, in deren Folge an der Knochenoberfläche Strömungspotentiale generiert werden. Nach einem Modell von Harrigan und Hamilton sind Osteoblasten und Osteozyten in der Lage, Differenzen zwischen extra- und intrazellulärem Potential wahrzunehmen. Daraus resultierende Veränderungen des Membranpotentials könnten danach einen Einfluß auf die Physiologie der Osteoblasten haben (*Harrigan und Hamilton, 1993*).

Der Stellenwert der Strömungspotentiale in der Mechanosensitivität wird jedoch noch kontrovers diskutiert und bedarf weiterer Untersuchungen, da offensichtlich nur eine sehr schwache Kopplung zwischen mechanischer Belastung und elektrischen Signalen besteht (*Jones et al, 1995*).

1.2.1.2. Mechanosensitive Ionenkanäle

Untersuchungen von Guharay und Sachs mit Muskel- und Endothelzellen wiesen erstmals auf eine Steuerung von Ionenkanälen durch mechanische Kräfte hin (*Guharay und Sachs, 1984*). Mechanosensitive Kalium- und Calciumkanäle konnten in der Folge auch in Osteoblasten von Ratte und Mensch identifiziert werden und sind mit dem Zytoskelett assoziiert (*Duncan und Misler, 1989; Davidson et al, 1990; Ypey et al, 1992*). Ionenkanäle könnten somit eine initiale Rolle bei der Vermittlung des mechanischen Reizes spielen, jedoch ist der genaue Mechanismus, der zur Öffnung der Kanäle führt, bisher unklar. Ergebnisse von Jones und Bingmann weisen darauf hin, daß eine Öffnung von Kaliumkanälen nach Aktivierung der Phospholipase C und Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels erfolgt (*Jones und Bingmann, 1991*).

1.2.1.3. Mechanotransduktion mit Beteiligung des Zytoskeletts

Andere Autoren gehen von einem Zusammenspiel von extrazellulärer Matrix, transmembranen Rezeptoren und dem Zytoskelett aus (*Burridge et al, 1988*). Man nimmt an, daß durch die mechanische Belastung die extrazelluläre Matrix bewegt wird. Diese ist durch transmembrane Rezeptoren, die Integrine, mit dem Zytoskelett verbunden, welches dann die Information weiterleiten kann (*Ingber, 1991*). Integrine nehmen als heterodimere Transmembranproteine eine assoziative Aufgabe hinsichtlich der Verbindung der extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts wahr und werden als funktionelle, mechanochemische Transduktionsproteine in Betracht gezogen (*Hynes, 1987; Ingber, 1991*). Eine Reihe von Experimenten zeigen, daß zytoskelettäre Elemente am Mechanotransduktionsmechanismus beteiligt sind. Eine Desintegration des Actin-Zytoskeletts mit Cytochalasin D bewirkt zum Beispiel eine Insensitivität von Zellen bezüglich der Akkumulation von cAMP (*Watson et al, 1995*).

1.2.1.4. Die Rolle des Ziliums

Zilien sind in der Lage, Bewegung wahrzunehmen und zu erzeugen. Aus Zentriolen hervorgehende Mikrotubuli werden als primäres Zilium bezeichnet. Es ist bekannt, daß Osteozyten ein primäres Zilium ausbilden und Knorpelzellen sogar ein gut entwickeltes Zilium besitzen (*Federman und Nichols, 1974*). Oft ist das Zilium nur rudimentär entwickelt, allerdings reicht schon eine Länge von 500 nm, um Bewegung wahrzunehmen (*Satir et al, 1990; Jones et al, 1995*). Es ist jedoch nicht erwiesen, ob Osteoblasten ein primäres Zilium besitzen und wenn, ob sie damit mechanische Belastung wahrnehmen können.

1.2.2. Zelluläre Transduktionsmechanismen

Knochenzellen antworten auf mechanische Stimuli mit der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Abbildung 1.2.2-1 zeigt einen Überblick der an der Mechanotransduktion teilnehmenden Signalkaskaden.

Signal cascade in mechano-transduction

- 1) Transducer
 - One
 - Multiple
- 2) 2nd Messenger
 - One
 - Multiple (this is most likely)
- 3) Immediate effects (within 1 s)
 - PLC activation
 - Gap junction communication
 - Ion channel activation
- 4) Release of signalling molecules (e.g., NO through Ca²⁺)
- 5) Intermediate effects within 1-2 min
 - Arachidonic acid metabolism
 - cAMP (Ca²⁺ or PGE₂)
 - cGMP (through NO)
- 6) Late effects (2 min – 6 h)
 - Gene activation (EGR-1? cfos)
- 7) Secondary effects
 - Effects due to release of translated genes, e.g., TGF- β , IGF

Abbildung 1.2.2-1 An der Mechanotransduktion teilnehmende Signalkaskaden.
 Aus Jones et al (1995).

Jones et al beschrieben eine unmittelbare Aktivierung der Phosphatidylinositol Phospholipase C (PI-PLC) innerhalb von Millisekunden, gefolgt von einem Anstieg der intrazellulären Konzentration für Calcium-Ionen (Jones et al, 1991). Erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen leiten eine nachfolgende interzelluläre Kommunikation über gap junctions ein, die eine radiale Reichweite von 4-5 Zellen aufweist (Hansen et al, 1995).

Innerhalb von Minuten nach mechanischer Belastung kommt es zu einem Anstieg von cAMP, cGMP und Calcium (Rodan et al, 1975; Harell et al, 1977). Ein weiterer Effekt mechanischer Deformationen auf Knochenzellen ist eine Prostaglandin E₂-Synthese innerhalb von Minuten (Somjen et al, 1980).

Des weiteren kommt es innerhalb von 1-2 Minuten zu einer NO-Produktion in Knochenzellen (Pitsillides et al, 1995; Johnson et al, 1996). NO übt als

kurzlebige Radikal konzentrationsabhängige Effekte auf Knochenzellen aus.

Eine Aktivierung der Kinasekaskaden (ERK1/ERK2) findet innerhalb von 4-7 Minuten nach Deformation statt und wird als allgemeines Proliferationssignal angesehen (*Schmidt et al, 1998*).

Zu den späten Effekten einer mechanischen Belastung zählt eine c-fos Expression 30 Minuten bis 2 Stunden nach Applikation, des weiteren konnte eine transkriptionelle Synthese von TGF- β und IGF-I detektiert werden (*Raab-Cullen et al, 1994*). Außerdem wird eine Reorganisation des Zytoskeletts ausgelöst, d.h. eine Actinde- und -repolymerisierung sowie eine Assoziation von Fokalkontakten.

1.3. Experimentelle Ansätze zur Untersuchung des Einflusses von Schwerelosigkeit und mechanischer Entlastung auf den Knochen

Mit dem Beginn bemannter Raumfahrtprojekte in der Mitte des 20. Jahrhunderts werden Astronauten im Weltraum mit veränderten Umgebungsbedingungen konfrontiert. Neben der Strahlungseinwirkung handelt es sich dabei in erster Linie um die auftretende Schwerelosigkeit (0g). Im Rahmen dieser 0g-Bedingungen kommt es bei Astronauten zu einer Vielzahl physiologischer Veränderungen. In Abhängigkeit von der Dauer des Weltraumaufenthaltes treten unterschiedlich stark ausgeprägte Adaptationsprozesse in den Bereichen des Elektrolythaushaltes, des Immunsystems, des Herz-Kreislauf-Systems, der Ventilation und des aktiven und passiven Bewegungsapparates auf.

Beispielsweise zeigten Messungen der Knochendichte nach einem 84 tägigen Aufenthalt in der Schwerelosigkeit bei Astronauten eine Verminderung um 4% im Calcaneus, die Werte von Ulna und Radius dagegen blieben unauffällig. Der Knochenverlust betraf also bevorzugt die tragenden Skelettabschnitte (*Rambaut und Johnston, 1979*). Schätzungen zufolge beträgt der durchschnittliche Knochenverlust unter schwerelosen Bedingungen etwa 1-2 % pro Monat (*Tilton et al, 1980*).

Ausgehend von diesen Beobachtungen an Astronauten konnte bisher in einer Vielzahl von Experimenten gezeigt werden, daß das Knochengewebe unter schwerelosen Bedingungen sowohl auf Gewebe- als auch auf zellulärer Ebene zahlreiche Veränderungen erfährt.

1.3.1. Experimente in vivo

Histologische Analysen der Knochen von Ratten, die auf Weltraumflügen mitgeführt wurden, zeigten eine Verminderung des kortikalen periostalen Wachstums (*Morey und Baylink, 1978; Spengler et al, 1983; Wronski und Morey, 1983; Wronski et al, 1987*) und Veränderungen von Knochenmasse und Trabekelstruktur (*Vico et al, 1988; Vico et al, 1993*). Eine verminderte Knochenmineralisierung wurde bei Affen nach 11,5 Tagen unter schwerelosen Bedingungen gefunden (*Zerath et al, 1996*).

Experimente unter schwerelosen Bedingungen sind naturgemäß begrenzt und sehr kostenaufwendig. Es wurden daher Verfahren entwickelt, die eine Untersuchung mechanischer Entlastung unter Laborbedingungen ermöglichen. In „hindlimb elevation“ Experimenten mit Ratten wurde dies verwirklicht, indem man künstlich eine Entlastung der Hinterläufe vornahm. Die entlasteten Skelettabschnitte wiesen eine reduzierte trabekuläre Knochenmasse und ein vermindertes Längenwachstum auf, zusätzlich eine Verminderung der Osteoblastenpopulation bei einer erhöhten Anzahl Osteoklasten (*Wronski und Morey-Holton, 1986*). Halloran et al konnten systemische Veränderungen infolge mechanischer Entlastung zeigen, die neben einem vorübergehenden Anstieg von Calcium im Serum in einem Abfall von Osteocalcin und 1,25-Dihydroxyvitamin D bestanden (*Halloran et al, 1986*). Ergebnisse von Zhang et al zeigten, daß Entlastung die mRNA-Level für TGF beta 2, IGF-2 und Osteopontin vermindert (*Zhang et al, 1995*). Ergebnisse von Bikle et al zeigten ein verändertes Muster der Genexpression in vivo sowohl infolge „hindlimb elevation“ Experimenten als auch bei Weltraumflügen in Rattenknochen (*Bikle et al, 1994*). Die mRNA-Level für IGF-I, IGF-Rezeptor und Alkalische Phosphatase zeigten

eine vorübergehende Zunahme bei einer Abnahme des mRNA-Levels für Osteocalcin. Dies wurde als Hinweis darauf gewertet, daß durch eine mechanische Entlastung die Osteoblastenreifung verzögert wird und der Übergang von Matrixbildung zu Mineralisation verlangsamt wird.

1.3.2. Experimente in vitro

Ergebnisse von Al-ajmi et al legen nahe, daß Gravitation einen direkten Einfluß auf die Osteoblastenaktivität hat. In Clinostat-Experimenten wurde eine verminderte Zellproliferationsrate nach 3 Tagen in Ratten-Osteosarkomzellen gefunden (Al-Ajmi et al, 1993). Veränderungen der Zellmorphologie von ROS 17/2.8 Osteosarkomzellen wurden in Parabelflugexperimenten (Guignandon et al, 1995) und in Bion-10 Weltraumflügen (Guignandon et al, 1997) beschrieben, welche in einer Reduktion der Zelloberfläche und Formunregelmäßigkeiten bestanden.

Ergebnisse von Hughes-Fulford und Lewis (1996) zeigten neben Veränderungen der Zellmorphologie mit reduzierter Anzahl von Stressfasern auch um 30 % kleinere Zellkerne und eine verminderte Prostaglandinsynthese nach Wachstumsstimulierung mit Serum im Vergleich zu Bodenkontrollen bei Osteoblastenkulturen, die 9 Tage unter schwerelosen Bedingungen kultiviert wurden.

Aus diesen Beobachtungen kann bisher nicht auf den Mechanismus der Graviperzeption auf zellulärer Ebene geschlossen werden. Unklarheit besteht auch darüber, ob ein separater Gravitationssensor in Osteoblasten existiert.

Verschiedene Hypothesen sind aufgestellt worden, wobei eine Beteiligung des Zytoskeletts oft favorisiert wird (Cipriano, 1991; Sievers, 1993), obwohl kürzlich auch andere Mechanismen vermutet wurden (Schatz et al, 1993). Eine Beteiligung des Zytoskeletts bei der Mechanotransduktion konnte bereits in einer Vielzahl von Untersuchungen an zahlreichen Zellarten gezeigt werden (Jones et al, 1991; Jones und Leivseth, 1994; Schirrmacher et al, 1992; Ingber, 1991; Ingber und Folkman, 1989). Eine

andere Möglichkeit der Gravi- und Mechanosensation besteht in einer Interaktion mit Ionenkanälen. Denkbar wäre eine direkte Interaktion, durch ein zytoskelettäres Element (*Golz und Thurm, 1991*) oder indirekt durch einen second messenger (*Jones und Leivseth, 1994*).

Eine Möglichkeit, die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen der Graviperzeption zu beleuchten, stellt die Untersuchung der Genexpression dar.

Während der Osteoblastendifferenzierung kommt es zu einer sequentiellen Genexpression. Während der Proliferationsphase werden die Gene c-fos und c-jun exprimiert, während der Phase der Matrixbildung und Reifung Typ-I- Kollagen und Alkalische Phosphatase und schließlich Osteocalcin und Osteopontin während der Mineralisationsphase (*Stein et al, 1996*).

MG-63 Zellen, die 9 Tage unter schwerelosen Bedingungen kultiviert wurden, wiesen nach hormoneller Stimulation eine verminderte Genexpression für Kollagen Typ I, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin auf. Diese Ergebnisse wurden als ein möglicher Hinweis auf eine verminderte hormonstimulierte Differenzierung unter schwerelosen Bedingungen gewertet (*Carmeliet et al, 1997*).

In Osteoblastenkulturen zeigte sich nach 5 Tagen unter schwerelosen Bedingungen eine Zunahme der mRNA Expression für Interleukin-6 und Prostaglandin G/H Synthetase mit gesteigerter Prostaglandin-2 Synthese (*Kumei et al, 1996*). Kumei et al konnten in weiteren Experimenten zeigen, daß Schwerelosigkeit Insulin-like growth factor (IGF) bindende Proteine und Glukokortikoidrezeptoren in Osteoblasten verändert (*Kumei et al, 1998*). Die Expression des IGF BP-3 wurde ebenso stimuliert wie die mRNA für den Glukokortikoidrezeptor, während IGF BP-5 inhibiert wurde.

In den bisherigen Experimenten konnte somit gezeigt werden, daß Knochenzellen unter schwerelosen Bedingungen eine Veränderung auch hinsichtlich der Genexpression erfahren, eine umfassende Genanalyse jedoch ist bisher noch nicht durchgeführt worden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Auswirkungen von Schwerelosigkeit auf das Knochengewebe ist Gegenstand vieler Experimente. Bisherige Untersuchungen lassen Fragen bezüglich der unmittelbaren Aktivierung von Signalwegen und resultierender Änderungen der Genexpression offen.

Ziel dieser Arbeit ist zu prüfen, ob kurze Phasen von Schwerelosigkeit, erzeugt durch ein Parabelflugmanöver, die Genexpression in Osteoblasten verändert. Osteoblastenkulturen, die schwerelosen Bedingungen während eines Parabelflugs ausgesetzt sind, werden mit Influgkontrollen und Laborkontrollen hinsichtlich der Genexpression verglichen.

In der vorliegenden Arbeit werden zur Untersuchung dieser Fragestellung primäre bovine Osteoblastenkulturen verwendet, von denen bekannt ist, daß sie auf eine mechanische Stimulierung in Form von physiologischen Dehnungsreizen sehr sensitiv in Form einer erhöhten Proliferationsrate reagieren.

Die Analyse der Genexpression erfolgt mit der Differential Display Methode, die eine vergleichende Genanalyse erlaubt. Sowohl aktivierte wie auch supprimierte Gene können detektiert werden. Die Entdeckung neuer Gene ist ebenfalls möglich. Bisherige Experimente waren dagegen auf die gezielte Untersuchung der Genexpression bekannter, knochentypischer und -relevanter Gene beschränkt.

Erkenntnisse über die Genaktivierung infolge schwerelosier Bedingungen sollen zu einem besseren Verständnis beteiligter Signalwege und physiologischer Veränderungen in Osteoblasten beitragen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Lösungen und Puffer

Acrylamidstammlösung	Polyacrylamid	38 % (w/v)
	N,N'-	2 % (w/v)
	Methylenbisacrylamid	
Denhardt's Lösung (50 X)	Ficoll	1 % (w/v)
	Polyvinylpyrrolidon	1 % (w/v)
	Rinderserumalbumin	1 % (w/v)
Gel-Probenpuffer (10 X)	EDTA	20 mM
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	Saccharose	40 % (w/v)
Inkubationspuffer für Re- striktionsendonukleasen OPA 10 X (Pharmacia)		
PBS	NaCl	136 mM
	KCl	2,6 mM
	Na ₂ HPO ₄	8 mM
	KH ₂ PO ₄	1,1 mM
	pH 7,4	
SSC (20 X)	NaCl	3 M
	tri-Natriumcitrat	0,3 M
	pH 7,0	
TE	Tris/HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8,0	

TBE (10 X)	Tris/HCl Borsäure EDTA pH 8,3	1 M 1 M 20 mM
X-Gal		2 % (w/v) in Dimethylformamid
Vitamin C – Phosphat (WAKO Chemical Ind., Japan) Stammlösung		5 mg/ml PBS
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid)- Stammlösung		100 mM (sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C)

2.1.2. Längenstandards

1 kb-Leiter	GIBCO	
100 bp-Leiter	GIBCO	

2.1.3. Oligonukleotide

AP-16	5'-CGTCAGTGAC-3'
AP-17	5'-GCAAGGAGTC-3'
AP-18	5'-CTGAGCTAGG-3'
AP-19	5'-GGCTAATGCC-3'
AP-20	5'-GTGATCGGAC-3'
T ₁₂ MG	5'-TTTTTTTTTTTTMG-3'
T ₁₂ MA	5'-TTTTTTTTTTTTMA-3'
T ₁₂ MT	5'-TTTTTTTTTTTTMT-3'
T ₁₂ MC	5'-TTTTTTTTTTTTMC-3'
T7	5'-AATACGACTCACTATAGGGCGA-3'
SP-6	5'-ATTAGGTGACACTATAGAATAC-3'

Anmerkung: M=äquimolare Menge der Nukleotide G, A und C

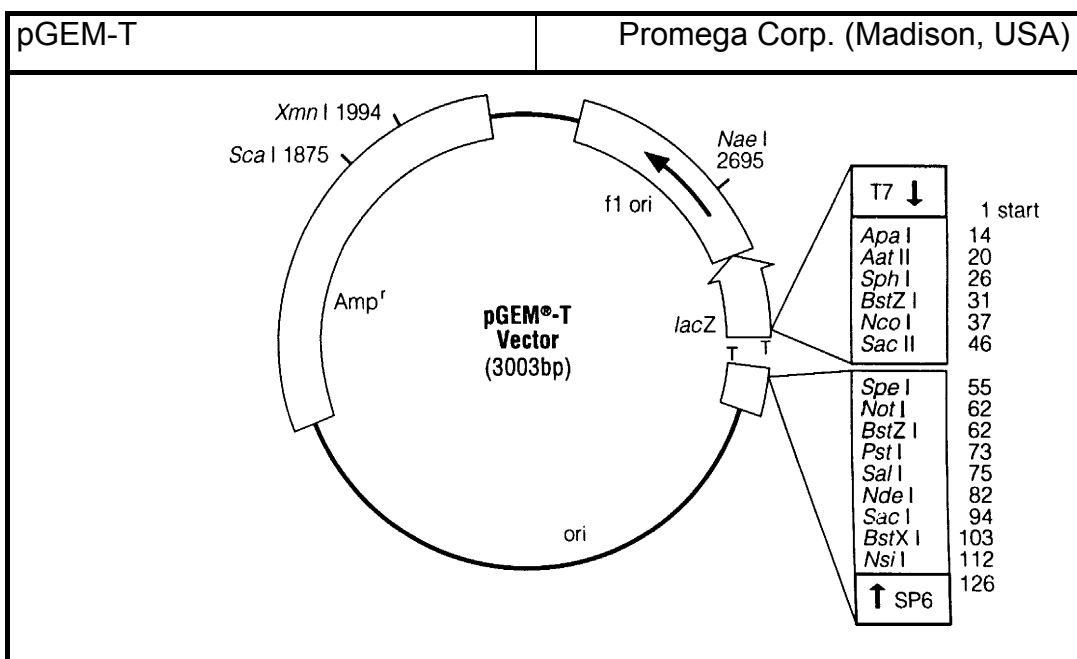
2.1.4. Bakterienstämme

Escherichia coli DH5Alpha	
---------------------------	--

2.1.5. Primärzellen

Primäre bovine Osteoblasten	(Jones et al, 1991)
-----------------------------	---------------------

2.1.6. Plasmide



2.1.7. Nährmedien

LB-Medium	Pepton, tryptisch verdaut	1,0 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	0,5 % (w/v)
	pH 7,2	
LB-Agar	LB-Medium	
	Agar-Agar	1,5 %

Fötales Kälberserum (FCS) Boehringer Mannheim Chargennr. 14713902 Seromed Chargennr. SO112/511S		
Earles Puffer (Sero-med)		
Ham's F10 (GIBCO)		
High Growth Enhancement Medium (Bio Whittaker)	Modifiziertes DMEM, Fructose statt Glucose	
Medium mit Hepes Zusatz		Medium mit NaHCO ₃ Hepes 10 mM
Tyrodellösung	NaCl KCl CaCl ₂ MgCl ₂ NaHCO ₃ NaH ₂ PO ₄ Glucose	136,9 mM 2,68 mM 1,8 mM 1,05 mM 11,9 mM 0,42 mM 5,55 mM pH 6,8 für 5 Vol % CO ₂

Anmerkung: Zellkulturmedien wurden mit 10 % FCS, 10 µg/ml Vit. C-Phosphat, 2 mM L-Gln und Penicillin/Streptomycin supplementiert.

2.1.8. Geräte und verwendete Materialien

ELISA-Reader	Titertek Multiscan Flow Laboratories
Begasungsbrutschrank für die Zellkultur	Heraeus Instruments

Sterilisationsofen	Heraeus Instruments
Autoklav	Guwina Berlin
Vier-Punkt-Dehnungsmaschine incl. Motor und Steuereinheit	Eigenentwicklung (<i>Jones et al, 1991</i>)
Zentrifuge für Kontrollexperimente	Eigenentwicklung
Gewebekulturschalen für die Zellkultur	Nalge Nunc International
Counter Z1	Coulter
Sterilfilter 0,22 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
PCR-Gerät Gene Amp 9600	Perkin-Elmer
Sterilwerkbank	Gelaire BSB
Zentrifugen	Eppendorf 5415
	Heraeus Christ Biofuge A
	Beckman J2-21 M/E Hettich Universal
Rotoren	JA20 Beckman

Anmerkung: Die zur üblichen Standardlaborausrüstung zählenden Geräte und Materialien werden an dieser Stelle nicht aufgeführt.

2.1.9. Chemikalien

Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck, Serva, Sigma, Fluka, Biolabs, Boehringer Mannheim, Clontech, Biorad, Pharmacia, Gibco BRL, Falcon, Amersham, Stratagene, Calbiochem und Molecular Probes.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Dabei wurde im wesentlichen nach Lindl und Bauer (*Lindl und Bauer, 1994*) verfahren. Zellkulturen wurden als Monolayer in Petrischalen kultiviert. Es wurden verschiedene Medien mit einem 10 %igen Anteil FCS (Fötales Kälberserum) und Antibiotikazusatz verwendet. High Growth Enhancement Medium wurde als Wachstumsmedium für die Zellkultivierung nach der Knochenpräparation benutzt, Ham's-F10 und Ham's F-10-Hepes Medium für die Kultivierung vor den Experimenten.

2.2.2. Präparation von primären bovinen Osteoblasten

Aus dem Periost von Metakarpalen boviner Knochen wurden Osteoblasten nach dem Auswuchsverfahren nach Jones et al (*Jones et al, 1991*) gewonnen. Die Knochen entstammten frisch geschlachteten Jungbullen (18 Monate) des örtlichen Schlachthofs.

Unter sterilen Bedingungen wurde der Knochen zunächst freipräpariert und mit sterilem PBS gespült. Mit einem Skalpell wurde das Periost in Streifen vom Knochen entfernt, in Earles Puffer überführt und 3 mal für 10 min bei 37 °C gewaschen. Zuletzt erfolgte noch ein Waschvorgang unter Zugabe von 250 U/ml Penicillin und 375 U/ml Streptomycin für 20 Minuten in Earles Puffer. Die Perioststreifen wurden in 5 X 5 mm große Stückchen zerteilt, in einem Verhältnis von 1 cm² zu 15 cm² Kulturfläche auf Petrischalen ausgesetzt und mit High Growth Enhancement Medium versorgt. Am Folgetag erfolgte ein erster Mediumwechsel, um Fette abzuspülen. Während der weiteren Kultivierung wurde das Medium wöchentlich gewechselt. Nach 4-5 Wochen erreichte die Kultur Konfluenz, die Osteoblasten wurden direkt für Experimente verwendet oder für eine Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren (s. Pkt. 2.2.3). Durch Kollagenasebehandlung wurden die Zellen passagiert. Regelmäßige Phänotypisierung

gen anhand der Expression knochenspezifischer Proteine wurden im Labor durchgeführt.

Material:

High Growth Enhancement Puffer

Earles Puffer

Penicillin/Streptomycin

2.2.3. Kryokonservierung

Für die Langzeitlagerung der primären bovinen Osteoblasten wurden diese bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Passagieren der Zellen und Bestimmung der Zellzahl wurde die Konzentration der Suspension auf 10^6 /ml eingestellt. Kurz vor dem Einfriervorgang wurde 1 Volumen Einfriermedium zur Suspension gegeben und die Zellen in Kryoröhrchen auf Eis gebracht. Darauf folgte die langsame Abkühlung in einem Styroporbehälter (2-4 cm Wandstärke) in einem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Gefrierschrank. Nach 12 Stunden konnten die Zellen dann in einen Flüssigstickstoffbehälter überführt werden.

Zum Auftauen wurden die Gefrieröhrchen in ein $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad gestellt und nach Zugabe von vorgewärmtem Medium (Ham's-F10) sedimentiert (200 x g für 10 min). Nach Aufnahme in Medium wurden die Zellen in Kulturgefäße ausgesetzt. Nach 24 Stunden erfolgte ein erster Mediumwechsel.

Material:

Einfriermedium

Hams F10

10 %(v/v) DMSO (Dimethylsulfosid)

2.2.4. Spezielle Kulturbedälter

2.2.4.1. Zelldehnungsschalen

Zelldehnungsschalen bestehen aus flexiblen Polykarbonatplatten, auf die Silikonbegrenzungen (medizinischer Qualitätsgrad) mit Aquariumsilikonkleber von Dow Corning geklebt wurden. Nach Aushärtung des Klebers über Nacht wurden die Behälter für 24 Stunden in Wasser gelegt, um verbliebenes Azetat zu entfernen. Eine Gassterilisation erfolgte vor dem Aussäen der Zellen.

2.2.4.2. Zentrifugenschalen

Zentrifugenschalen sind geschlossene Kulturbedälter, die mit Medium vollständig befüllt werden können, um Flüssigkeitsbewegungen zu vermeiden (siehe folgende Abb. 2.2.4.2-1). Auf Polykarbonatplatten wurden Silikonbegrenzungen (3 mm Höhe) mit Aquarienkleber (Dow Corning) aufgebracht. Nach Aushärtung des Klebers über Nacht wurde eine gasdurchlässige Biofolie auf den Rahmen geklebt. Um Azetat und Monomere zu entfernen, wurde steriles PBS über Kanülen in die Schalen eingefüllt. Die Sterilisierung erfolgte mit 70 %igem Alkohol für mindestens 20 Minuten.

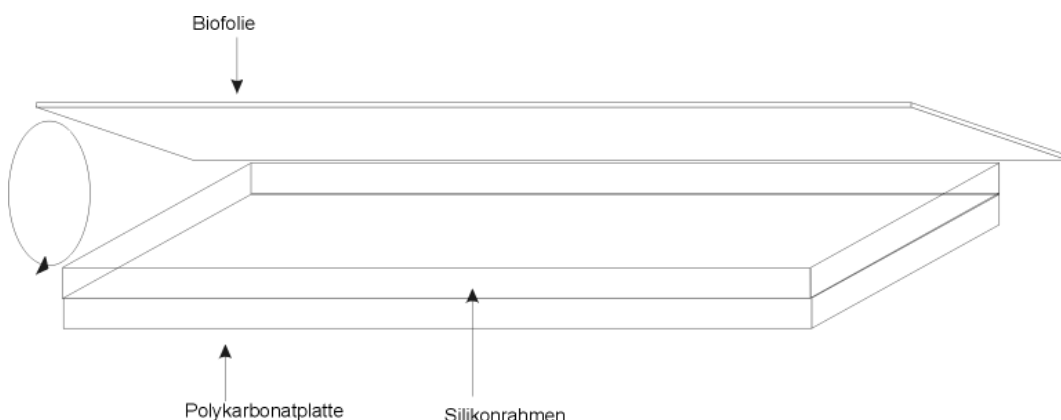


Abbildung 2.2.4.2-1 Zentrifugenschale

Material:

Biofolie (Heraeus)

Silikonmatten (medizinischer Qualitätsgrad 55 Shore A)

Aquarien-Silikonkleber (Dow Corning)

Polykarbonatplatten

2.3. Experimente mit primären bovinen Osteoblasten

2.3.1. Das Parabelflugexperiment

Das Parabelflugexperiment wurde 1996 in einer von der ESA (European Space Agency) und der DLR (Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V.) geförderten Kampagne durchgeführt, die von Novespace und CNES (Centre National D'Etudes Spatiales) organisiert wurde. Durch ein spezielles Flugmanöver, den Flug einer Parabel, befand sich das Flugzeug für eine begrenzte Zeit von 25 Sekunden in Schwerelosigkeit. Die Flugdauer von 2,5 Stunden beinhaltete 2 Gruppen mit jeweils 15 Parabeln. Jede Parabel, die ca. 65 Sekunden dauerte, beinhaltete 3 Phasen: während der *Beschleunigungsphase* stieg die Beschleunigung für eine Dauer von 20 Sekunden auf 1,8g, dann folgten 25 Sekunden bei 0g (die *Phase der Schwerelosigkeit*) und am Ende der Parabel folgte noch eine *Phase bei 1,8g* für 20 Sekunden. Nach einem Intervall von 2 Minuten bei 1g folgte dann der Flug der nächsten Parabel.

Untenstehende Abbildung verdeutlicht das g-Profil (Abb. 2.3.1-1).

G-Profil

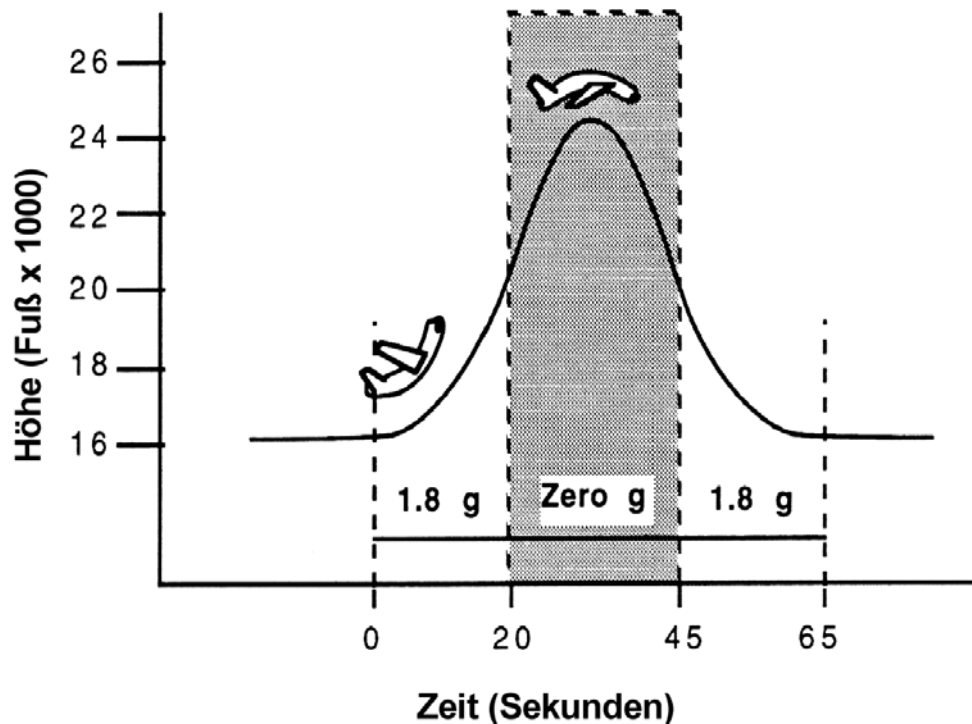


Abbildung 2.3.1-1 G-Profil einer Parabel

Versuchsablauf und Durchführung: Primäre bovine Osteoblasten wurden 48 h vor dem Experiment mit einer Zelldichte von 40.000/cm² subkonfluent in speziell angefertigte Kulturschalen (s. Pkt. 2.2.4.2) ausgesetzt und bei 37 °C inkubiert. Als Kulturmedium diente Ham's F-10 mit HEPES-Zusatz (zur atmosphärenunabhängigen pH-Wert-Pufferung). Am Tag des Experiments wurden die Behälter nach Überprüfung auf Konfluenz der Kultur im Flugzeug in den Inkubator (37 °C) eingebracht. Nach der Flugzeuglandung wurden die Kulturbedälter auf Eis gestellt. Die Zellen wurden vor Ort mit Lysepuffer aufgenommen und für die spätere RNA-Isolierung (s. Pkt. 2.4.1.1) bei –20 °C eingefroren. Die entsprechende Probe wurde in der Arbeit als *F0g* (Parabelflug) bezeichnet.

Neben der schwerelosen Phase sind auch Auswirkungen der vermehrten Beschleunigung auf 1,8g, aber auch Effekte durch Flugbedingungen wie Druckschwankungen und Vibrationen denkbar. Mögliche Veränderungen

der Genexpression primärer boviner Osteoblasten, die einem Parabelflug ausgesetzt sind, können somit nicht ohne weiteres der schwerelosen Phase zugeordnet werden. Daher wurden zusätzliche Kontrollexperimente mit primären bovinen Osteoblasten durchgeführt: als Influgkontrolle diente eine Zentrifugation auf 1g während der schwerelosen Phase. Ein Laborexperiment mit intermittierender Beschleunigung auf 1,8g sollte isoliert die Auswirkung vermehrter Beschleunigung untersuchen. Zum Vergleich einer mechanischen Entlastung während 0g mit einer mechanischen Belastung im physiologischen Bereich diente ein zusätzliches Dehnungsexperiment.

2.3.1.1. Influg Kontrollexperiment

Prinzip der Influgkontrollzentrifugation ist die intermittierende Beschleunigung der Zellkultur primärer boviner Osteoblasten auf 1g während der 0g Phase der Parabel, so daß sich dieses Kontrollexperiment lediglich durch die fehlende 0g-Phase vom eigentlichen Experiment unterschied. Folgende Abbildung (Abb. 2.3.1.1-1) zeigt den zeitlichen Ablauf der Zentrifugation.

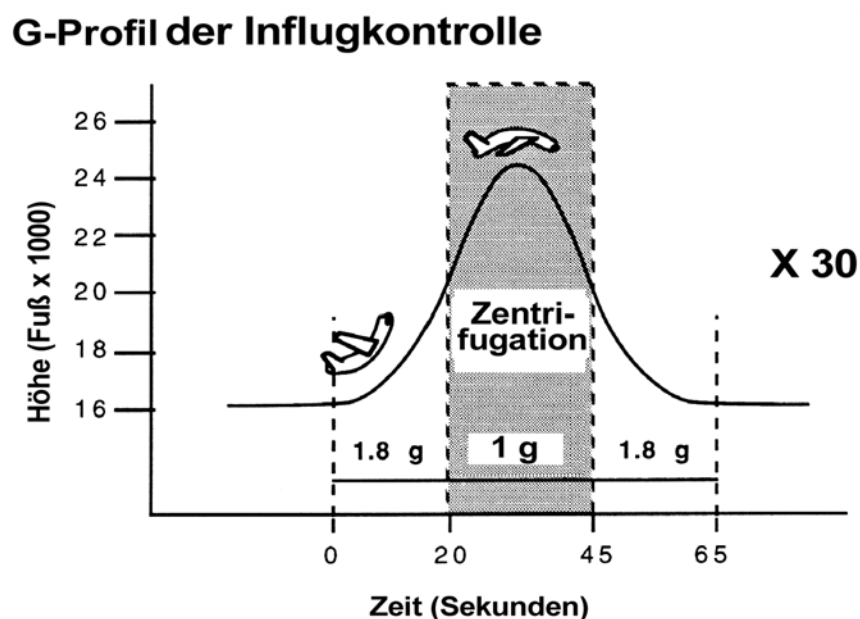


Abb. 2.3.1.1-1 G-Profil der Influgkontrolle

Die im eigenen Labor entwickelte Zentrifuge (s. Abb. 2.3.1.1-2) beschleunigt hierbei die primären bovinen Osteoblastenkulturen auf 1g. Als Motor dient ein Diskettenlaufwerkmotor (aus einem 5 1/4" Laufwerk), der bei konstanter Geschwindigkeit von 360 Umdrehungen/Minute läuft. Ein Getriebe übersetzt auf die gewünschte Umdrehungszahl. Da die Zentrifuge einen Radius von 12 cm aufweist, benötigt man eine Übersetzung von 4,1:1, das entspricht 87 Umdrehungen pro Minute, um auf 1g zu beschleunigen.

Versuchsablauf und Durchführung: Primäre bovine Osteoblasten wurden unter den in Pkt. 2.3.1 beschriebenen Bedingungen in Zentrifugenschalen (s. Pkt. 2.2.4.2) kultiviert und an Bord am Ausschwenkrotor der Zentrifuge befestigt. Während der 0g-Phasen wurden die Zellkulturen auf 1g beschleunigt. Die Zellkulturen wurden nach der Flugzeuglandung auf Eis gestellt, vor Ort mit Lysepuffer aufgenommen und für die spätere RNA-Isolierung bei -20 °C eingefroren. Die entsprechende Probe wurde in der Arbeit mit *FK* (Influgkontrolle) bezeichnet.

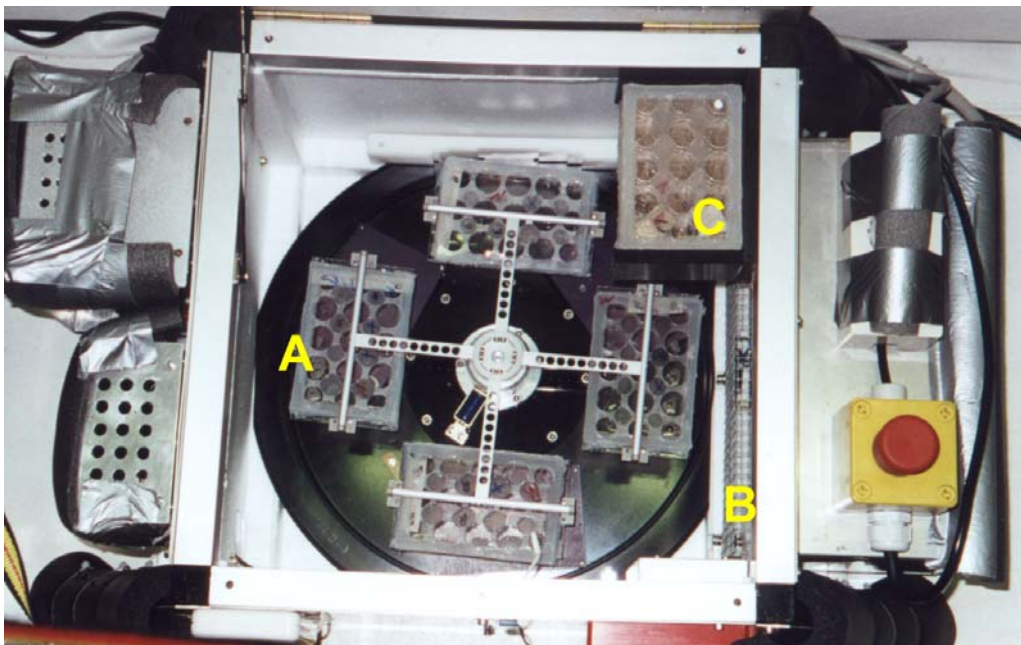


Abb. 2.3.1.1-2 Kontrollzentrifuge

A=Zentrifugenschale mit Kontrollzellen (s. Pkt. 2.2.4.2), B=Heizung (37 °C), C=Zellkulturbehälter mit Zellkulturen, die 0g ausgesetzt werden

2.3.2. Kontrollexperimente im Labor

2.3.2.1. Kontrollzentrifugation bei 1,8g

Mit diesem Experiment wurden mittels der oben beschriebenen Zentrifuge (s. Abb. 2.3.1.1-2) die Auswirkungen einer intermittierenden Zentrifugation bei 1,8g auf primäre bovine Osteoblasten untersucht. Dabei wurde das Profil des Parabelflugs übernommen, also eine Beschleunigung auf 1,8g entsprechend 30 Parabeln.

Versuchsablauf und Durchführung: Primäre bovine Osteoblasten wurden wie in den Flugexperimenten bis Erreichen der Konfluenz in Zentrifugenschalen (s. Pkt. 2.2.4.2) in Vollmedium (Ham's F-10) mit HEPES-Zusatz kultiviert. Die Zellkulturbehälter wurden am Ausschwenkrotor der Zentrifuge befestigt und bei 37 °C intermittierend auf 1,8g beschleunigt. Nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C erfolgte die Zellysierung für die spätere RNA-Isolierung (s. Pkt. 2.4.1.1) Die entsprechende Probe wurde in der Arbeit als 1,8g (Zentrifugation bei 1,8g) bezeichnet.

Folgendes Schema verdeutlicht den Ablauf:

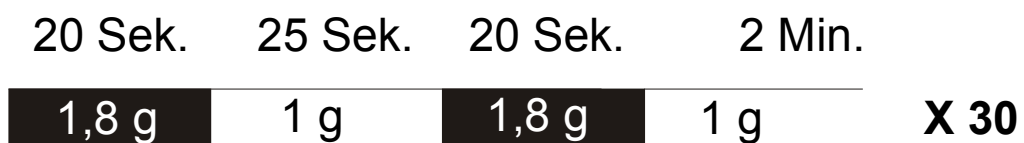


Abb. 2.3.2.1-1 Profil der Zentrifugation bei 1,8 g

2.3.2.2. Dehnungsexperiment mit der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine

Mit der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine wurden primäre bovine Osteoblasten intermittierend einem Dehnungsreiz von 4000 μ strain ausgesetzt, was einer physiologischen mechanischen Belastung entspricht. Dies ermöglichte im folgenden den Vergleich der Genexpression von primären

bovinen Osteoblasten, die kurzen Phasen von Schwerelosigkeit ausgesetzt waren, mit solchen, die intermittierend mechanisch belastet wurden. Mit der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine (*Jones et al, 1993*) ist es möglich, Zellen Dehnungsreizen zwischen 500 μ strain und 10.000 μ strain auszusetzen (s. Abb. 2.3.2.2-1).

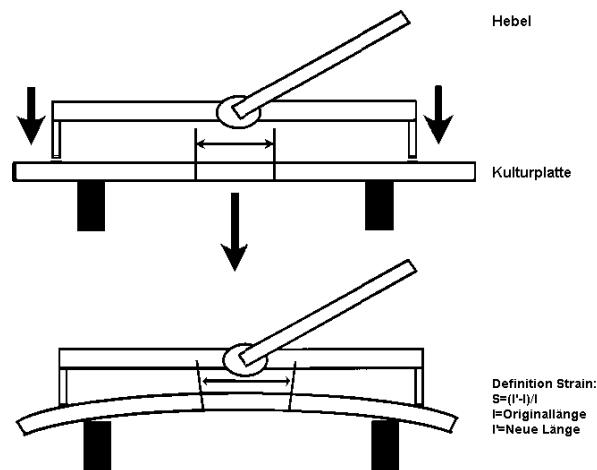


Abb. 2.3.2.2-1 Schematische Zeichnung einer Vier-Punkt-Dehnungsmaschine (*Jones et al., 1993*)

Der Dehnungsreiz wird mit der dimensionslosen Einheit „Strain“ appliziert, wobei 1 Strain (S) eine Längenänderung von 100 % bedeutet.

$$S = \frac{4hy}{D^2 + 4y^2}$$

Die geometrische Beschreibung in o.g. Gleichung erlaubt die exakte Kalibrierung der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine für einen bestimmten Reiz, wobei h die Stärke des Materials, D den Abstand der Widerlager und y die Auslenkung darstellen. Die Frequenz der Dehnungsintervalle ist stufenlos am Elektromotor regelbar, der über einen Hebelarm die Dehnungsapparatur antreibt.

Versuchsablauf und Durchführung: Die primären bovinen Osteoblasten wurden einen Tag vor dem Experiment mit einer Zelldichte von 60.000/cm² konfluent in Ham's F-10 auf spezielle Zelldehnungsschalen ausgesät (s.

Pkt. 2.2.4.1). Am Folgetag wurde mindestens 6 Stunden vor Experimentbeginn das Medium durch Ham's F-10 mit HEPES-Zusatz ersetzt, die Zelldehnungsschalen in die Maschine eingebracht und bei 37 °C gedehnt: es wurde insgesamt 30 mal für 25 Sekunden bei 4000 μ strain und 1 Hz gedehnt. Unterbrochen wurden die Dehnungsphasen von 160 Sekunden ohne Dehnungsreiz. Dies entspricht der Zeit zwischen den 0g-Phasen des Parabelflugs. Nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C erfolgte die Zellysierung für die spätere RNA-Isolierung (s. Pkt. 2.4.1.1). Die entsprechende Probe wurde in der Arbeit als *D* (Dehnung) bezeichnet.

Der zeitliche Ablauf sah folgendermaßen aus:



Abb. 2.3.2.2-2 Profil des Dehnungsexperimentes

2.3.2.3. Dehnungskontrollexperiment

Beim Dehnungskontrollexperiment wurden die primären bovinen Osteoblasten unter identischen Bedingungen wie in Abschnitt 2.3.2.2 beschrieben kultiviert. Jedoch wurden diese Zellen keiner mechanischen Belastung ausgesetzt, sondern nach einer Inkubation bei 37 °C entsprechend der Dauer des Dehnungsexperiments - zeitgleich mit den Zellkulturen des Dehnungsexperimentes - lysiert. Die entsprechende Probe wurde in der Arbeit als *DK* (Dehnungskontrolle) bezeichnet.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. RNA-Isolierung aus Zellkulturen

2.4.1.1. Isolierung der Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde nach einer adaptierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) vorgegangen. Dieses Verfahren beruht auf der quantitativen Denaturierung von Proteinen durch Guanidiniumisothiocyanat, einer sauren Phenolextraktion und zwei aufeinanderfolgenden Isopropanolfällungen. Zunächst wurde die Kulturschale zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, anschließend wurde zur Lysierung der Zellen 1,5 ml Lösung D auf der Schale verteilt. Mit einem sterilen Zellschaber wurden die Zellbestandteile abgelöst und in ein steriles 14 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde zur Senkung des pH-Werts 1/10 Vol. Natriumacetat (pH 4) hinzugefügt. Nach der nun folgenden Proteinextraktion mit 1 Vol. saurem Phenol (pH 4) und 1/5 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol wurde die Lösung für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde kräftig geschüttelt und anschließend nach Zugabe von 1 ml eines Gemisches von Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1 für 10 Minuten bei 3000 rpm und RT (Sigma 3K-1) zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 Vol. Isopropanol gefällt. Hierzu wurde die Probe für mindestens 1 Stunde bei -20°C gelagert. Im Anschluß wurde für 20 Minuten bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet der gefällten Nukleinsäuren in 300 μl Guanidiniumlösung aufgenommen und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine weitere Präzipitation mit 1 Vol. Isopropanol für mindestens 1 Stunde bei -20°C , eine Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge (14.000 x g), ein Waschen des Pellets mit 75 % Ethanol und Resuspension in sterilem DEPC-ddH₂O. Über eine photometrische Bestimmung des Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ wurde die Reinheit der Probe ermittelt (s. Pkt. 2.4.2). Zur Qualitätsbestimmung wurde ein Teil der Probe in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel (s. Pkt. 2.4.3.1) separiert, wobei das Verhältnis 18S:28S bei 1:2 liegen sollte.

Material:

Lösung D (Lyselösung)

Guanidinium-Isothiocyanat	4 M
Natriumcitrat	25 mM, pH 7,0
N-Lauryl-Sarkosin	0,5 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	0,1 M
Natriumacetat	2 M pH 4,0
Phenol	äquilibriert, pH 4,0
Chloroform:Isoamylalkohol	49:1

2.4.1.2. Entfernung genomischer DNA aus RNA-Präparationen

Für die Anwendung des Differential Display ist die Vermeidung einer DNA-Kontamination der RNA-Proben erforderlich. Hierzu wurde eine Behandlung mit DNase I durchgeführt.

Es wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Gesamt-RNA (<50 µg) in DEPC-ddH ₂ O	50 µl
10 X Reaktionspuffer	5,7 µl
DNase I (10 U/µl)	1 µl

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, dann wurden Proteine durch Zugabe von 40 µl Phenol/CHCl₃ (3:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde zur Präzipitation mit 5 µl 3 M Natriumacetat und 200 µl Ethanol versetzt und für eine Stunde bei –80 °C gelagert. Die RNA wurde nun bei 4 °C und 14.000 x g für 5 Minuten sedimentiert, luftgetrocknet und in 15 µl DEPC-ddH₂O gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei 260 nm (s. Pkt. 2.4.2) wurden die Proben bei –80 °C gelagert.

Material:

10 X DNase Reaktionspuffer

2.4.2. Photometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung

Nukleinsäuren weisen im UV-Bereich bei 260 nm ein Absorptionsmaximum auf (Sambrook et al, 1989). Dies wird zur Konzentrationsbestimmung genutzt. Bei einer Schichtdicke von 1cm entspricht eine OD₂₆₀ 50 µg /ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA.

Da Proteine bei 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen, wurde die Reinheit der Probe über den Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 war die Probe frei von Proteinverunreinigungen.

2.4.3. Elektrophoresetechniken

Nukleinsäuren wandern aufgrund ihrer negativen Ladung in einem Spannungsfeld vom negativen zum positiven Pol, wobei die Laufgeschwindigkeit von der Größe der Fragmente abhängt. Dies ermöglicht die räumliche Separation von Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge in einem Agarosegel.

2.4.3.1. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA-Proben erfolgte in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen in Horizontal-Elektrophoresekammern. Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wurden 2 g Agarose in 160 ml H₂O gelöst und 40 Minuten autoklaviert. Nach Abkühlung des Gels auf ca. 60 °C erfolgte die Zugabe von 2 ml NaAc (0,5 M)/EDTA (0,1 M) pH 7,2, 2 ml MOPS-Puffer (MOPS: 4-Morpholinpropansulfonsäure ; 2 M, pH 7,3), 33ml 37 %iges Formaldehyd und 10 µl Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml).

Ethidiumbromid assoziiert mit RNA, fluoresziert unter UV-Licht und ermöglicht so die Darstellung der RNA-Banden. 20 µg RNA wurden in einem Volumen von 15 µl ddH₂O (DEPC) gelöst und mit 4 µl RNA-Probenpuffer versetzt. Vor Beladung der Geltaschen wurde der Ansatz mindestens 15 Minuten bei 65 °C inkubiert, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu

verhindern. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 V/cm für 4 Stunden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografisch dokumentiert. Bei einer gelungenen RNA-Präparation und Gelelektrophorese sind 18S- und 28S-rRNA als deutliche Banden zu erkennen, wobei die 28S-rRNA bei intakter RNA in etwa doppelt intensiv erscheinen sollte wie die 18S-rRNA-Bande.

Material:

Elektrodenpuffer

MOPS	20 mM, pH 7,2
EDTA	1 mM, pH 7,2
NaAc	5 mM
Ethidiumbromid (10mg/ml)	2 µl/100 ml

2.4.3.2. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

In Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration können DNA-Fragmente zwischen 200 bp und 50 kb effektiv aufgetrennt werden (*Sambrook et al*, 1989). Die Zugabe von Ethidiumbromid, welches in doppelsträngige DNA interkaliert und unter UV-Bestrahlung fluoresziert, ermöglichte die Lokalisierung im Gel. Agarosegele wurden in Konzentrationen zwischen 0,7 % und 4 % (w/v) eingesetzt (hochkonzentriert bei kleinen Fragmentgrößen). Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 1 X TBE-Puffer versetzt und anschließend aufgekocht. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und Abkühlung wurde die Gellösung in einen mit einem Geltaschenkamm ausgestatteten Gelschlitten gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine horizontal ausgerichtete mit TBE-Puffer (1 X) gefüllte Gelelektrophoresekammer transferiert. Die Präparation der DNA-Probe erfolgte durch Zugabe von 1/10 Vol. Gel-Probenpuffer (6 X). 10 bis 20 µl der Probe wurden in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente fand bei 10 V/cm statt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und analysiert. Mittels

eines zusätzlich aufgetragenen Standards konnte die Größe und Konzentration der DNA-Proben ermittelt werden.

2.4.3.3. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte gemäß den Herstellerangaben z.B. von Qiagen (Qiaex II Agarose Gel Extraction). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA wurden die gewünschten DNA-Banden aus den ethidiumbromidgefärbten Gelen auf einem UV-Schirm (320 nm) mit einem sterilen Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten, in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und gewogen. Nach Zugabe von 300 µl Puffer QX1 je 100 mg Gel und 10 µl Qiaex II (Glasmilch) wurde die Mixtur für 10 Minuten bei 50 °C inkubiert. Die an den Glaspartikelchen adsorbierte DNA wurde pelletiert (30 Sekunden, 14.000 x g) und anschließend einmal mit Puffer QX1 und zweimal mit Puffer PE (je 500 µl) gewaschen. Nachdem das Pellet für 15 min bei RT getrocknet wurde, folgte die Elution der DNA in mindestens 10 µl Tris/HCl (pH 8,0). Der DNA-haltige Überstand wurde nach Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration per Agarosegel bestimmt.

Material:

Puffer QX1

Puffer PE

Qiaex II Glasmilch

2.4.4. Differential-Display Technik

Die Methode des Differential Display wurde entwickelt, um differentiell exprimierte Gene in Zellen zu identifizieren, die unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt werden (*Liang und Pardee, 1992; Zhang et al, 1996; Liang et al, 1992*). Das Verfahren beruht auf dem Vergleich der mRNA verschiedener Zellen, wobei 95 % der insgesamt 15.000 mRNA Species berücksichtigt werden. Durch reverse Transkription und Polymeraseket-

tenreaktionen mit Hilfe von vier Poly(T)-Primern und 20 unterschiedlichen 5'-Primerdekameren werden die mRNA-Moleküle in 160 separate Subpopulationen unterteilt. Durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide können die cDNA-Fragmente im Gel visualisiert werden, wobei simultan mehrere Proben verglichen werden können. Nach der Isolierung differierender Fragmente werden diese zur Identifizierung kloniert und sequenziert. Im folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte näher beschrieben, wobei nach dem Firmenprotokoll von „GenHunter“ vorgegangen wurde.

Folgende Abbildung gibt einen Überblick des Prinzips einer Differential Display Analyse (Abb. 2.4.4-1).

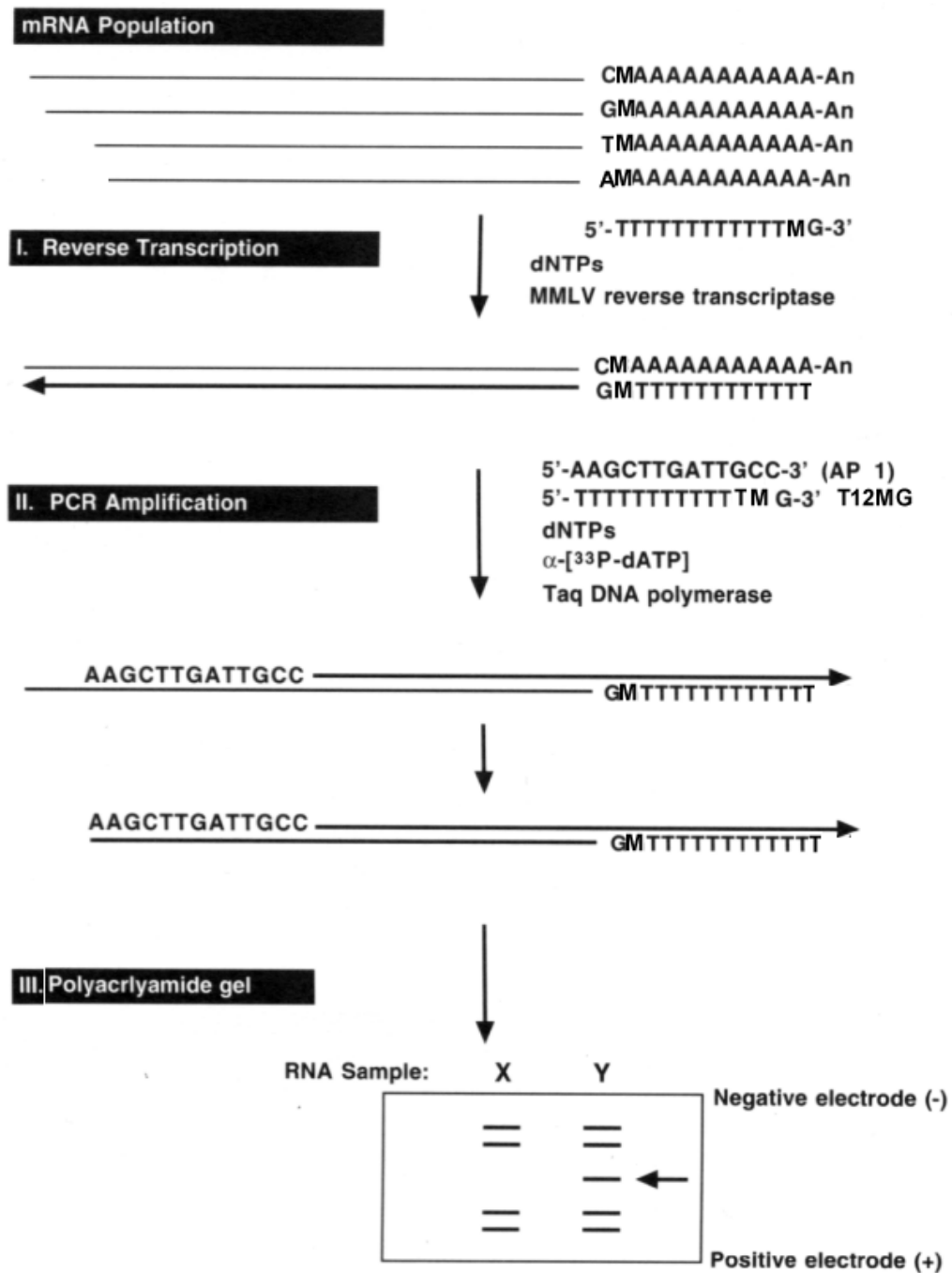


Abb. 2.4.4-1 Differential Display Analyse, aus „GenHunter“-Protokoll

2.4.4.1. Reverse Transkription

Nach einer Behandlung der RNA mit DNase (s. Pkt 2.4.1.2), um die Reinheit der RNA zu gewährleisten, wurde je RNA-Probe folgender Ansatz vierfach für die Reverse Transkription pipettiert:

ddH ₂ O	9,4 µl
5 X RT-Puffer	4 µl
dNTP (250 µM)	1,6 µl
RNA (100 ng/µl)	2 µl
T ₁₂ MN (10 µM)	2 µl

Die Reaktionen wurden in einer PCR-Maschine für 5 Minuten bei 65 °C, 60 Minuten bei 37 °C und 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Reverse Transkriptase (100 U, MMLV) wurde 10 Minuten nach Start der Inkubation bei 37 °C zur Reaktion hinzugefügt. Jede der 4 Reaktionen enthält entweder T₁₂MG, T₁₂MA, T₁₂MT oder T₁₂MC (M=äquimolares Verhältnis von A, G, und C) und unterteilt somit die RNA in 4 Subpopulationen von cDNA, die in den folgenden Polymerasekettenreaktionen weiter unterteilt werden.

2.4.4.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) können Nukleotidsequenzen in vitro enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Man nutzt hierbei die Eigenschaft spezieller, besonders hitzestabiler DNA-Polymerasen aus, die einen Einzelstrang zum Doppelstrang aufpolymerisieren können, sofern ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Die PCR läuft nach folgendem Prinzip ab: Man lässt zwei synthetisierte Oligonukleotide, die zu den beiden Randbereichen des gewünschten Fragments komplementär sind, mit dem Nukleinsäuregemisch hybridisieren. Die Oligonukleotide können nun als Startpunkt für eine Polymerase genutzt werden, die den komplementären Strang zum gewünschten Fragment synthetisiert. Die entstandenen Doppelstränge werden denatu-

riert und die im Überschuß vorhandenen Oligonukleotide wieder hybridisiert, so daß die Reaktion von vorne ablaufen kann, wodurch es zu einem exponentiellen Zuwachs an Matrixmolekülen kommt.

Zur PCR wurde jede der 4 synthetisierten cDNA-Populationen mit je fünf 5'-Primern (AP 16-20) eingesetzt. Dies entspricht 25 Prozent der Gesamtzahl möglicher Primerkombinationen.

ddH ₂ O	9,95 µl
10 X PCR Puffer	2 µl
dNTP (25 µM)	1,6 µl
AP-Primer 16-20 (2 µM)	2 µl
T ₁₂ MN (10 µM)	2 µl
cDNA (aus RT-Reaktion)	2 µl
α ³³ P-dATP	0,25 µl
Taq-DNA Polymerase	0,2 µl

Es wurde folgendes PCR-Profil verwendet:

40 Zyklen	
94 °C	30 s
40 °C	120 s
72 °C	30 s
Extension	
72 °C	5 min

Gegenüber Standard PCR-Bedingungen fällt hier eine erniedrigte dNTP-Konzentration von 200 nM auf. Dies bewirkt eine erhöhte Spezifität der DNA-Amplifikation und ist notwendig, um einen effizienten Einbau radioaktiv markierter Nukleotide zu ermöglichen.

2.4.4.3. Polyacrylamidgelelektrophorese zur Darstellung der PCR-Produkte

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte im Unterschied zur Originalliteratur unter nicht-denaturierenden Bedingungen. In denaturierenden Gelen lassen sich räumlich benachbarte Banden häufig einer Sequenz zuordnen (*Beobachtungen von L. Suva, Harvard University Boston, USA; siehe auch Mason et al, 1997*). Nicht-denaturierende Gele vermeiden dies, jedoch ist hier eine Überdeckung positiver Signale möglich. Die Häufigkeit der Überdeckung ist aber gering, so daß eine Verwendung nicht-denaturierender Gele zweckmäßiger ist. Für die Gelelektrophorese stand ein ‚GenomxLR DNA-Sequencer‘ zur Verfügung. Das Gel wurde folgendermaßen hergestellt:

Die Glasplatten der Größe 40 x 70 cm wurden gründlich erst mit H₂O, dann mit Ethanol (absolut) gereinigt und die Innenseite der Deckplatte mit Silikonisierungslösung behandelt, um zu gewährleisten, daß das Gel auf der Gelplatte hängenblieb und sich leicht von der Deckplatte lösen ließ. Unter Verwendung von Abstandhaltern wurden die Glasplatten zusammengeklammert.

Gelzusammensetzung:

30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid 29:1	20 ml
H ₂ O	70 ml
10 X TBE	10 ml
APS (Ammoniumpersulfat, 25 % (w/v))	280 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylen-Ethylendiamin)	35 µl
Bromphenolblau (10 % (w/v))	100 µl

Die Gellösung wurde luftblasenfrei mit Hilfe einer speziellen Gießvorrichtung zwischen die geklammerten Platten gegossen und ein Sägezahnkamm eingeführt. Nach einer Polymerisationszeit von 2 Stunden wurde

das Gel in der Apparatur befestigt und die Pufferkammern mit 1 X TBE befüllt. 3,5 µl der PCR-Proben wurden mit 2 µl Gelprobenpuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 2800 V und 45 °C für 2,75 h. Im Anschluß wurde die Deckplatte vorsichtig abgehoben, das auf der Gelplatte haftende Gel erneut in die Apparatur eingebracht und für mindestens 20 Minuten getrocknet. Die Autoradiographie fand bei RT über Nacht statt.

2.4.4.4. Isolierung von differierenden Banden und Reamplifizierung

Ziel des Differential Displays ist es, über die vergleichende Betrachtung des Bandenmusters der verschiedenen RNA-Proben differentiell exprimierte Gene zu entdecken. In den vergangenen Jahren wurden vielfältige Vorschläge zur Verbesserung der Differential Display-Methode gemacht, die insbesondere das Problem einer hohen Anzahl 'falsch-positiver Banden' im Polyacrylamidgel berücksichtigen (*Callard et al, 1994; Mou et al, 1994*). Zur Vermeidung bzw. Reduktion solcher Fragmente wurde jede PCR-Reaktion wiederholt und nur differierende Fragmente, die in beiden PCR-Reaktionen auftauchten, isoliert. Des weiteren wurden nur Fragmente ab einer Größe von 150 bp berücksichtigt und auch nur solche, die als sehr deutliche Bande in einer Spur und in den anderen überhaupt nicht erkennbar waren.

Zur Isolierung wurde die Bande exakt aus dem Film herausgeschnitten und das Autoradiogramm deckungsgleich auf dem Gel fixiert. Mit einem sterilen Skalpell wurde die entsprechende Bande aus dem Gel entfernt, mit 1 µl sterilem H₂O aufgenommen und in ein steriles PCR-Gefäß überführt. Das Gelstückchen wurde direkt für die nachfolgende PCR-Reaktion zur Reamplifizierung mit der entsprechenden Primerkombination eingesetzt:

ddH ₂ O	23,4 µl
10 X PCR Puffer	4 µl
dNTP (250 µM)	3,2 µl
AP-Primer (2 µM)	4 µl
T ₁₂ MN (10 µM)	4 µl
cDNA	1 µl
Taq-DNA Polymerase	0,4 µl

PCR-Profil:

40 Zyklen	
94 °C	30 s
40 °C	120 s
72 °C	30 s
Extension	
72 °C	5 min

Anschließend wurden die Fragmente in einem 1,5 %igen DNA-Gel aufgetrennt (s. Pkt. 2.4.3.2). Bei isolierten Banden im Gel konnte das Amplifikat direkt für die nachfolgende Subklonierung verwendet werden. Einige Proben enthielten jedoch mehrere DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe und Konzentration. Hier wurde zunächst die stärkste Bande aus dem Gel extrahiert (s. Pkt. 2.4.3.3) und erneut in einer PCR-Reaktion amplifiziert, um eine ausreichende Menge DNA für die Ligation zu gewinnen.

2.4.4.5. Subklonierung und weitere Vorgehensweise

Erfolgreich reamplifizierte cDNA-Fragmente wurden in pGEM-T subkloniert (s. Pkt. 2.4.5) und nach Blau-Weiß-Screening wurden jeweils 10 positive Klone in einer 5 ml ÜN-Kultur bei 37 °C kultiviert und die Plasmide isoliert (s. Pkt. 2.4.7). Nach Kontrolle des Inserts (s. Pkt. 2.4.7.1) wurden die Plasmide für die nachfolgenden Bestätigungsverfahren der Reversen

Northern Analyse (s. Pkt. 2.4.9), der Northern Blot Analyse (s. Pkt. 2.4.8) und zur Identifizierung per Sequenzierung (s. Pkt. 2.4.10) eingesetzt.

2.4.5. Ligation und Klonierung von PCR-Produkten

Die Subklonierung von PCR-Fragmenten wurde mit dem pGEM-T-Vektorsystem durchgeführt. Sie basiert auf der Eigenschaft vieler thermostabiler DNA-Polymerasen, am 3'-Ende der amplifizierten Fragmente überhängende Desoxyadenosine anzuhängen (Clark, 1988). Ein überhängendes 3'-Desoxythymidin am linearisierten Vektor fördert die Ligation durch die Bereitstellung eines zum Desoxyadenosin kompatiblen Nukleotids. Zur Ligation wurde nach Herstellerangaben laut Promega Protokoll pGEM-T Vector Systems folgender Ansatz pipettiert:

T4 DNA Ligasepuffer 10 X	1 µl
pGEM-T (Promega) 50 ng/µl	1 µl
PCR-Produkt	X µl
T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Das molare Verhältnis Vektor:Insert wurde auf 1:1 eingestellt. Der Ligationsansatz wurde ÜN bei 6 °C inkubiert und anschließend 2 µl für eine Transformation in *E.coli* benutzt (s. Pkt. 2.4.6.2).

2.4.6. Bakterienkulturen

2.4.6.1. Präparation transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Aufnahme von rekombinanten Plasmidmolekülen muß die Zellwand der Bakterien durchlässig (transformationskompetent) gemacht werden. Dies wird durch Inkubation der Zelle mit CaCl₂ erreicht (Mandel und Higa, 1970). Fünf ml 2 X LB-Medium wurden mit einer *E.coli*-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am folgenden

Tag erfolgte ein Animpfen von 25 ml 2 X LB-Medium 1,5 %ig mit der ÜN-Kultur und Inkubation unter gleichen Wachstumsbedingungen wie die Vor-kultur, bis die Bakterien zu einer optischen Dichte von 0,6 (OD_{600}) herangewachsen waren. Zum Abstoppen des Zellwachstums wurde die Suspension 10 Minuten auf Eis gekühlt, dann für 10 Minuten bei 3000 rpm (Sigma Typ3K-1) und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml 50 mM $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Suspension regelmäßig geschwenkt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 2500 rpm und 4 °C wurde das Pellet in 1 ml $CaCl_2$ resuspendiert. Die so behandelten Bakterien waren nun für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent.

Lagerung von E.coli

In einer Nährlösung mit einem Glycerinanteil von 15 % und tiefen Temperaturen können die Bakterien mehrere Jahre aufbewahrt werden. 850 µl einer ÜN-Kultur wurden dazu mit 150 µl sterilem Glycerin versetzt und in einem Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

2.4.6.2. Transformation kompetenter E.coli und anschließende Selektion

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Vektor-DNA (s. Pkt 2.4.5) versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis, 90 Sekunden bei 42 °C und 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl sterilem SOC-Medium wurden die Bakterien bei 37 °C für 1 Stunde im Schüttler inkubiert. Die Transformationsansätze wurden dann auf die entsprechenden Agar-Platten (LB-Agar, 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert, denen 30 µl des Substrats X-Gal und 100 µl IPTG hinzugefügt wurde. Nach kurzem Antrocknen wurden die Platten ÜN bei 37 °C inkubiert.

Die Selektion der transformierten Bakterien geschieht über zwei verschiedene Systeme. Da Bakterien erst durch die Plasmidaufnahme eine Ampicillinresistenz erhalten, können sie von Wildtypbakterien bzw. von nicht-transformierten Zellen durch ihre Fähigkeit, auf Ampicillin-Agar-Platten zu

wachsen, getrennt werden. Anhand der "Blau-Weiß" Selektion lässt sich ermitteln, ob die erfolgreich transformierten Bakterien auch wirklich ein Plasmid tragen, das das einzuklonierende Fragment enthält. Bei Plasmiden, die das Fragment enthalten, ist das Gen für die β -Galaktosidase, welches durch IPTG induzierbar ist, zerstört. Diese Bakterien können das Farbsubstrat X-Gal nicht umsetzen und wachsen deshalb als weiße Kolonien. Im Gegensatz dazu bilden die anderen, mit nicht-rekombinanten Plasmiden transformierten Bakterien, blaue Kolonien.

Material:

LB-Medium

Ampicillin-Lösung (100 mg/ml)

X-Gal-Lösung (5-Bromo-4-Chloro-3-Indol- β -

D-Galaktosid in Dimethylformamid ;50 mg/ml)

IPTG-Lösung (Isopropylthiogalaktosid)

100 mM

LB-Agar

0,6 % (w/v) Agar in LB-Medium, 50 μ g /ml Ampicillin-Lsg.

SOC Medium pH 7,0

Trypton	2,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 μ M
Mg ²⁺	20 μ M
Glucose	20 mM

Für die weitere Kultivierung wurden jeweils 10 positive Klone gepickt und in einer 5 ml ÜN-Kultur bei 37 °C herangezogen, worauf die Plasmide in einer Minipräparation isoliert werden konnten (s. Pkt. 2.4.7).

2.4.7. Plasmid-Minipräparationen

Die Plasmid-Minipräparation ermöglicht eine qualitative Isolierung der Plasmid-DNA aus E.coli. Prinzip ist die alkalische Lyse der Bakterienzellwand (*Birnboim und Doley, 1979*) mit anschließender Neutralisierung zur Renaturierung der Plasmid-DNA.

Dazu wurde eine 5 ml LB-Kultur mit einer positiven Kolonie (s. Pkt. 2.4.6.2) inokuliert und ÜN bei 37 °C und 250 rpm (im Schüttelinkubator) inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 2.000 x g wurde das Zellpellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Es folgte eine Zugabe von 250 µl Puffer P2, Invertieren des Zentrifugenröhrchens und Zusetzen von 350 µl P3. Bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten. Der Überstand wurde auf eine Quiagen-Säule (Quiaprep Spin Column) gegeben und 30 Sekunden bei 14.000 x g zentrifugiert. Nach einem Waschvorgang mit 750 µl Puffer PE (30 Sekunden bei 14.000 x g) und erneutem Zentrifugieren zur restlosen Entfernung des Waschpuffers wurde die Plasmid-DNA in 50 µl TE-Puffer eluiert (30 Sekunden bei 14.000 x g).

Material:

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)

Tris/HCl	50 mM
RNase A	100 µg/ml (w/v)
EDTA pH 8,0	10 mM

Puffer P2 (Lysepuffer)

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Puffer P3 (Neutralisierungspuffer)

Kaliumacetat pH 5,5	3 M
---------------------	-----

Puffer PE

2.4.7.1. Restriktion

Nach erfolgter Minipräparation wurden die isolierten Plasmide einer Kontrollrestriktion unterzogen. Dabei sollte die Präsenz der korrekten Insert-DNA nachgewiesen werden.

10 µl des Eluats wurden mit einfach konzentriertem enzyspezifischen Puffer und je 1 µl *Apa I* und *Pst I* versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1/10 Vol. Gel-Probenpuffer gestoppt und der Ansatz in einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt (s. Pkt. 2.4.3.2).

Material:

OPA 10 X

Apa I 10 U/µl

Pst I 10 U/µl

2.4.8. Northern Blot Analyse

Bei der Northern Blot Analyse wird RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch einen Strom von Pufferflüssigkeit durch Kapillarkräfte auf einen Filter transferiert. Nach Fixierung auf eine Nitrocellulosemembran ist die Hybridisierung mit einer DNA-Sonde möglich. Die markierte Sonde wird nur dort binden, wo sie komplementäre RNA vorfindet und kann durch Autoradiographie lokalisiert werden. Das angefertigte RNA-Gel (s. Pkt. 2.4.3.1) wurde auf Integrität der RNA überprüft und mit einem Photo unter UV-Licht dokumentiert.

Für den Transfer der RNA auf einen Nylonfilter (Biodyne A, PALL) wurde die Blotapparatur (s. Abb. 2.4.10-1) folgendermaßen zusammengesetzt: 3 Lagen 3MM Whatman Papier wurden in das mit 10 X SSC befüllte Pufferreservoir eingebracht. Das Gel wurde auf das Blotpapier gelegt und luftblasenfrei mit einer Nylonmembran bedeckt. Die Gelränder wurden anschließend mit Parafilm abgedichtet, um den Lauf des Puffers nur durch die Membran zu gewährleisten. Im Anschluß wurde die Membran mit wei-

teren Lagen 3 MM Whatman Papier, saugfähigem Zellstoff und einem Gewicht (1 kg) bedeckt. Nach dem Transfer von 20 Stunden erfolgte die Fixierung der RNA im UV-Licht (254 nm, 5 Minuten) auf der Nylonmembran.

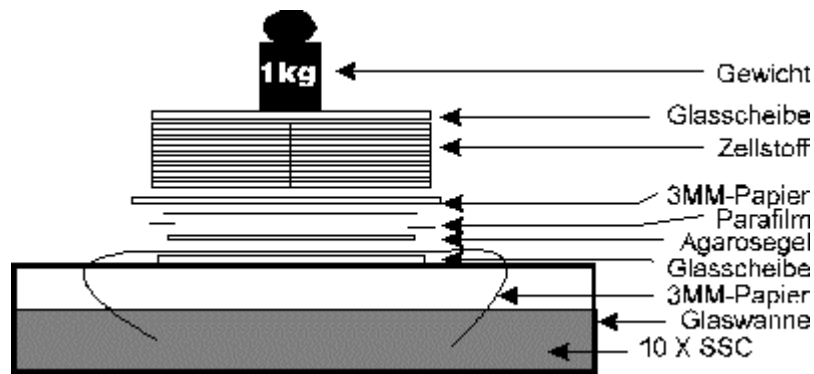


Abb. 2.4.10-1 Northern-Blot-Apparatur

Die Skizze zeigt den Transfer von RNA auf eine Nylonmembran. Der Flüssigkeitsstrom erfolgt vom Pufferreservoir nach oben zum Zellstoff, dadurch werden die Nukleinsäuren aus dem Agarosegel auf die darüberliegende Nylonmembran übertragen. Kleine Fragmente (<1000 bp) benötigen 1-2 Stunden, größere (>12 kb) mindestens 15 Stunden.

2.4.8.1. Radioaktive Markierung von DNA

Die Markierung von DNA-Sonden zur späteren Hybridisierung mit RNA erfolgte radioaktiv mit α - ^{32}P -dCTP und wurde nach der "random primed" Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der Hybridisierung einer Hexanukleotidmischung verschiedener Basensequenz an das zu markierende DNA-Fragment mit anschließender Synthese des komplementären Stranges von den 3'-Enden der Hexanukleotide her. Das radioaktiv markierte α - ^{32}P -dCTP wird in dem neu synthetisierten Strang als Substrat eingebaut.

Zur Markierung wurden 50 ng gereinigter DNA dem Standardprotokoll vom 'Oligolabelling Kit' (Pharmacia Biotech) folgend in die Reaktion eingesetzt:

DNA (50ng)	34 µl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (3000 Ci/mmol) (50 µCi)	5 µl
Reagent Mix	10 µl
ddH ₂ O	ad 49 µl
Klenow Fragment (10 U/µl)	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Hinzufügen von 5 µl 0,2 M EDTA (pH 8) gestoppt.

2.4.8.2. Aufreinigung von Sonden

Vor der Hybridisierungsprozedur erfolgte eine Aufreinigung der Proben mit Gelpermeationschromatographien mit Sephadex G-25 zur Entfernung nicht eingebauter dNTP's. Dabei wurden vorgefertigte Säulen mit 3 ml Gelbettvolumen (NAP-10, Pharmacia) mit einem Volumen H₂O äquilibriert, die Probe aufgetragen und mit 1,5 ml H₂O eluiert. Ein Aliquot der Probe von 10 µl wurde entnommen und die Radioaktivität der DNA mit einem Szintillationszähler ermittelt (LKB Pharmacia).

2.4.8.3. DNA-RNA-Hybridisierungen

RNA wurde nach dem Transfer auf eine Nylonmembran über eine Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden nachgewiesen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen der DNA-Sonde an die Membran erfolgte zunächst eine Inkubation für 4 Stunden bei 42 °C in Prähybridisierungslösung. Dazu wurde der Filter in Folie eingeschweißt und mit Prähybridisierungslösung versetzt (40 ml/100 cm² Filterfläche). Anschließend wurde die Lösung durch Hybridisierungslösung mit hitzedenaturiertem radioaktivem Sondenmaterial ersetzt (3 ml/100 cm²). Die Inkubation fand bei 42 °C über Nacht im Wasserbad statt. Um nicht hybridisiertes und unspezifisch gebundenes DNA-Sondenmaterial vom Filter zu entfernen, wurde dieser für 15 Minuten in 6 X SSC, danach für 10 Minuten bei RT in 0,1 X

SSC/0,1 % SDS (w/v) gewaschen. Danach wurde der Filter zur Exposition auf einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -70°C gelagert.

Material:

Prähybridisierungslösung (50 % Formamid)

Formamid	50 % (v/v)
SSC 20 X	25 % (v/v)
Na_2HPO_4 (1 M, pH 6)	5 % (v/v)
Fisch-DNA (denaturiert) (10 mg/ml)	0,8 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Denhardt's Lösung 100 X	5 % (v/v)
Magermilchpulver	1 % (w/v)
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (0,1 M)	2 % (v/v)

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung mit $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ - dCTP markierter DNA-Sonde	$1\text{-}2 \cdot 10^6$ cpm/ml
---	--------------------------------

2.4.9. Reverse Northern Analyse

Diese Methode wurde entwickelt, um die Anzahl sogenannter ‚falsch-positiver‘ Fragmente aus dem Differential Display zu reduzieren (*Zhang et al*, 1996). Mit einer vergleichbar geringen Menge RNA (20 μg) kann eine Vielzahl von cDNA-Fragmenten überprüft werden. Prinzipiell wird RNA der zu vergleichenden Proben per Reverser Transkription mit $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP markiert und zur Hybridisierung mit den isolierten aus dem Differential Display stammenden cDNA-Fragmenten verwendet. In einem einzigen Experiment kann somit ein Großteil der ‚falsch-positiven‘ Fragmente eliminiert werden. Für die Durchführung wurde laut Vorschrift der Firma GenHunter verfahren. Die isolierte Gesamt-RNA der im Differential Display verarbeiteten Proben (s. Pkt. 2.4.1.1) wurde vor der Markierung zunächst qualitativ per Gelelektrophorese überprüft (s. Pkt. 2.4.3.1).

Folgende Reaktion wurde je RNA-Spezies in ein PCR-Reaktionsgefäß angesetzt:

5 X RT-Puffer	8 µl
dNTPs (ohne dCTP) 500 µM	6 µl
T ₂₀ -Primer	4 µl
Gesamt-RNA	20 µg
α- ³² -P-dCTP	5 µl
ddH ₂ O	ad 36 µl

Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 65 °C, 60 min bei 37 °C und 5 min bei 75 °C. Reverse Transkriptase (4 µl) wurde 10 Minuten nach Beginn der Inkubationsphase bei 37 °C hinzugefügt. Die Aufreinigung der Sonden erfolgte gelpermeationschromatographisch mit Sephadex G-50, um nicht eingebaute dNTPs zu entfernen (s. Pkt. 2.4.8.2).

Material:

Reverser Transkriptionspuffer (5 X)

Tris/HCl pH 8,3	125 mM
KCl	188 mM
MgCl ₂	7,5 mM
Dithiothreitol	25 mM

MMLV Reverse Transkriptase (100 U/µl)

T₂₀-Primer (2 µM)

dNTPs (ohne dCTP) (500 µM)

α-³²P-dCTP (3.000 Ci/mM)

Sephadex G-50 Spin Columns

2.4.9.1. Dot Blotting

Prinzip der Dot Blot Hybridisierung ist die Übertragung einer Vielzahl von DNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran, die dann mit einer entsprechenden Sonde hybridisiert werden kann. Dazu wurden zunächst nach

Isolierung und Reamplifikation aus dem Differential Display Gel die entsprechenden Fragmente nach Ligation in pGEM in E.coli transformiert (s. Pkt. 2.4.6.2). Über Blau-Weiß-Screening wurden 10 positive E.coli-Kolonien mit einer sterilen Impföse in je 5 ml LB Medium überführt und ÜN bei 37 °C inkubiert. Zur Plasmidisolierung folgte die Minipräparation (s. Pkt. 2.4.7) und eine Kontrolle des Inserts im Agarosegel nach entsprechender Restriktion (s. Pkt. 2.4.7.1). Zur Herstellung der Amplifikate wurde eine PCR mit flankierenden Primern aus pGEM-T durchgeführt:

10 X PCR-Puffer	5 µl
dNTPs 2 mM	5 µl
Primer SP 6 (5'-flankierend) 5 µM	5 µl
Primer T 7 (3'-flankierend) 5 µM	5 µl
Plasmid-DNA	0,5 µl
ddH ₂ O	29 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl

Die Amplifikate (30 µl) wurden mit 10 µl 2 N NaOH unter gleichzeitigem Aufkochen für 5 Minuten denaturiert und durch Addition von 10 µl 3 M NaOAc pH 5,0 neutralisiert. Anschließend wurde das Volumen der Proben mit ddH₂O auf 110 µl eingestellt. Mit einer Dot-Blot-Apparatur von Biometra („Dot Blot 96“, s. Abb. 2.4.9.1-1) erfolgte der DNA-Transfer auf eine Nylonmembran. Eine passend zurechtgeschnittene Nylonmembran wurde kurz in 10 X SSC äquilibriert und in die Apparatur eingespannt. In jede Vertiefung wurde 10 X SSC eingefüllt und per Vakuum durch die Membran gesaugt. Dies wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Vertiefungen mit den Proben beschickt (10 µl der cDNA mit 10 µl 20 X SSC), wobei jede Probe zweifach an korrespondierender Stelle aufgetragen wurde. Nach einem Waschvorgang mit 10 X SSC wurde die Membran mindestens 20 Minuten getrocknet und anschließend per UV-Licht (Stratalinker, Stratagene) fixiert.

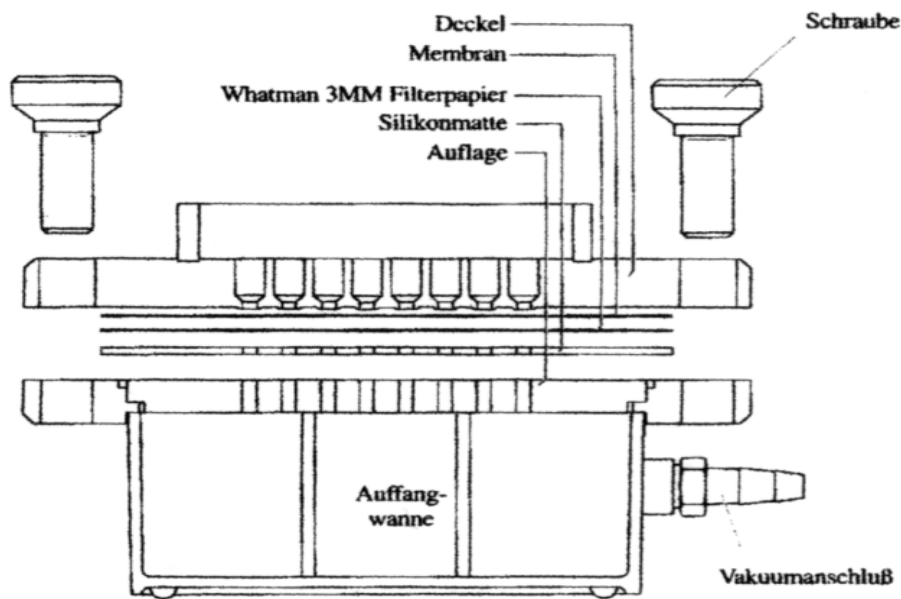


Abb. 2.4.9.1-1 Dot-Blot Apparatur

Material:

10 X PCR-Puffer

Tris/HCl	100 mM
KCl	500 mM
MgCl ₂	15 mM
Gelatine	0,01 %

2.4.9.2. Dot Blot Hybridisierung

Die Membran wurde zunächst für 4 Stunden bei 42 °C in Prähybridisierungslösung inkubiert. Dieser Schritt diente der Blockierung unspezifischer Bindungen der DNA-Sonde an die Nylonmembran. Danach wurde die Membran mit dem hitzedenaturierten radioaktiven Sondenmaterial versetzt und zur Hybridisierung über Nacht bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Die Membran wurde zweimal für 15 Minuten in 1 X SSC/0,1 % SDS (w/v) bei RT und anschließend für 15 Minuten bei 60 °C in 0,25 X SSC/0,1 % SDS (w/v) gewaschen, um nicht hybridisiertes Sondenmaterial vom Filter zu entfernen. Zur Exposition wurde der Nylonfilter auf einem Röntgenfilm

unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -70 °C gelagert. Nach einer Expositionszeit von 3 Tagen wurde der Film entwickelt.

Material:

Prähybridisierungslösung (50 % Formamid)

Formamid	50 % (v/v)
SSC 20 X	25 % (v/v)
Na ₂ HPO ₄ (1 M, pH 6)	5 % (v/v)
Fisch-DNA (denaturiert) (10 mg/ml)	0,8 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Denhardt's Lösung 100 X	5 % (v/v)
Na ₄ P ₂ O ₇ (0,1 M)	2 % (v/v)

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung mit	
α - ³² P-dCTP markierter DNA-Sonde	1-2 * 10 ⁶ cpm/ml

2.4.10. Sequenzierung

Die Sequenzierung der differierenden Fragmente wurde als Fremdauftrag mit einem ALF-Sequenziergerät der Firma Promega durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Arbeitsverlauf

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Schwerelosigkeit auf die Genexpression in primären bovinen Osteoblasten untersucht. Es sollte geklärt werden, ob Gene durch kurze Phasen von Schwerelosigkeit, wie sie in einem Parabelflug erreicht werden, aktiviert oder supprimiert werden. Dazu wurden Zellkulturen verschiedenen Bedingungen ausgesetzt und die Genexpression mit der Differential Display Methode untersucht.

Folgendes Schema gibt eine Übersicht über die durchgeführten Experimente und den Arbeitsverlauf:

Experimente mit primären bovinen Osteoblasten:

- ◆ Parabelflug mit Influgkontrollexperiment
- ◆ Kontrollexperimente im Labor
 - Zentrifugation bei 1,8g
 - Zelldehnungsexperiment

Analyse der Genexpression

- ◆ RNA-Isolation
- ◆ Differential Display: Isolierung und Reamplifizierung
differierender Fragmente
- ◆ Subklonierung von Fragmenten
- ◆ Bestätigungsverfahren: Reverse Northern Analyse,
Northern Blot Analyse
- ◆ Sequenzierung

3.2. Analyse der Genexpression

3.2.1. RNA-Isolation und Qualitätskontrolle

Die RNA-Isolierung der Zellkulturen, die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (s. Pkt. 2.3.1-2.3.2.2) ausgesetzt waren, erfolgte nach der Guanidinium-Isothiocyanatmethode (s. Pkt. 2.4.1.1).

Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung (s. Pkt. 2.4.2) wurden 20 µg der RNA in einem denaturierenden 1 %igen Agarose-Formaldehydgel gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Pkt. 2.4.3.1) und anhand der 18S und 28S Banden die Integrität der RNA überprüft. Folgende Abbildung zeigt die Dokumentation mit einer Polaroid-sofortbildkamera (Abb. 3.2.1-1).

Die im Gel separierte RNA wurde für spätere Northern Blot Analysen per Northern Blotting auf einen Filter transferiert und fixiert (s. Pkt. 2.4.8).

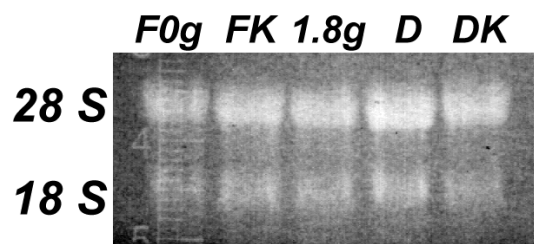


Abbildung 3.2.1-1 1 %iges Agarosegel der RNA-Proben

18S und 28S Banden sind deutlich erkennbar, wobei die 28S RNA -Bande doppelt so intensiv erscheint;

*F0g = Parabelflug; FK = Influgkontrolle; 1,8g = Zentrifugation bei 1,8g;
D = Dehnung; DK = Dehnungskontrolle.*

3.2.2. Differential Display

Die RNA-Proben wurden nach einer DNase-Behandlung (s. Pkt. 2.4.1.2) zur Entfernung von DNA-Kontaminationen im Differential Display-Verfahren eingesetzt. Die unter Abschnitt 2.4.4 ausführlich beschriebene Methode ermöglichte den simultanen Vergleich einer Großzahl von mRNA-Spezies aus Zellen, die unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt waren, mit dem Ziel, differentiell exprimierte Gene zu entdecken und zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von 5 verschiedenen Zellkulturen verglichen:

1. Parabelflug (F0g)
2. Influgkontrolle mit 1g-Zentrifugation (FK)
3. Zentrifugation bei 1,8 g (1,8g)
4. Dehnung (D)
5. Dehnungskontrolle (DK)

In einer Reversen Transkriptionsreaktion wurden die RNA-Proben (200 ng) mit Hilfe von vier Poly-d(T)-Primern (s. Pkt. 2.4.4.1) zunächst in 4 Subpopulationen unterteilt und anschließend in einer Kombination mit unterschiedlichen 5'-Primerdekameren in einer Polymerasekettenreaktion weiter separiert (s. Pkt. 2.4.4.2). Die radioaktiv markierten cDNA-Fragmente wurden anschließend gelelektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt (s. Pkt. 2.4.4.3).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Differential Display mit den vier verschiedenen Poly-d(T)-Primern in Kombination mit fünf 5'-Primern durchgeführt (AP 16-20), also 20 verschiedene Primerkombinationen je experimenteller Ansatz. Dies entspricht 25 Prozent der Gesamtzahl möglicher Primerkombinationen.

Im folgenden sollen die einzelnen Arbeitsschritte der Differential Display - Analyse anhand der Ergebnisse dokumentiert werden.

3.2.3. Differential Display Analyse

Das Bandenmuster aller Reaktionen wurde verglichen mit dem Ziel, Unterschiede zwischen den einzelnen Proben zu entdecken. Dabei wurden die 5 verschiedenen Proben (Parabelflug, Influgkontrolle, 1,8g-Zentrifugation, Dehnung und Dehnungskontrolle) stets parallel zum direkten Vergleich auf das Gel aufgetragen. Um die Zahl der ‚falsch-positiven‘ Fragmente zu reduzieren, wurde eine Duplikat-PCR jeder Reaktion durchgeführt und daneben aufgetragen. Außerdem wurden nur eindeutige Signale auf der Autoradiographie berücksichtigt, die in der entsprechenden Spur als deutliche und in einer anderen Spur überhaupt nicht erkennbar waren.

Untenstehende Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Differential Display-Gels (Abb. 3.2.3-1).

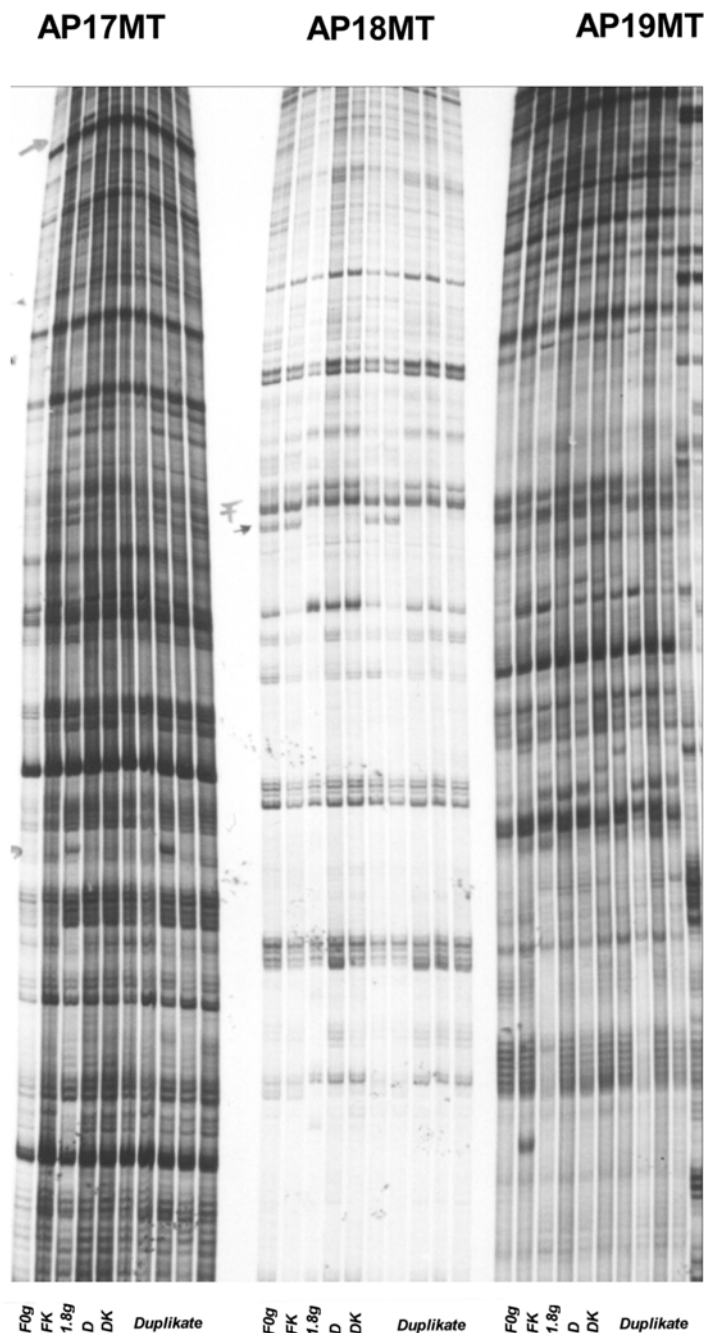
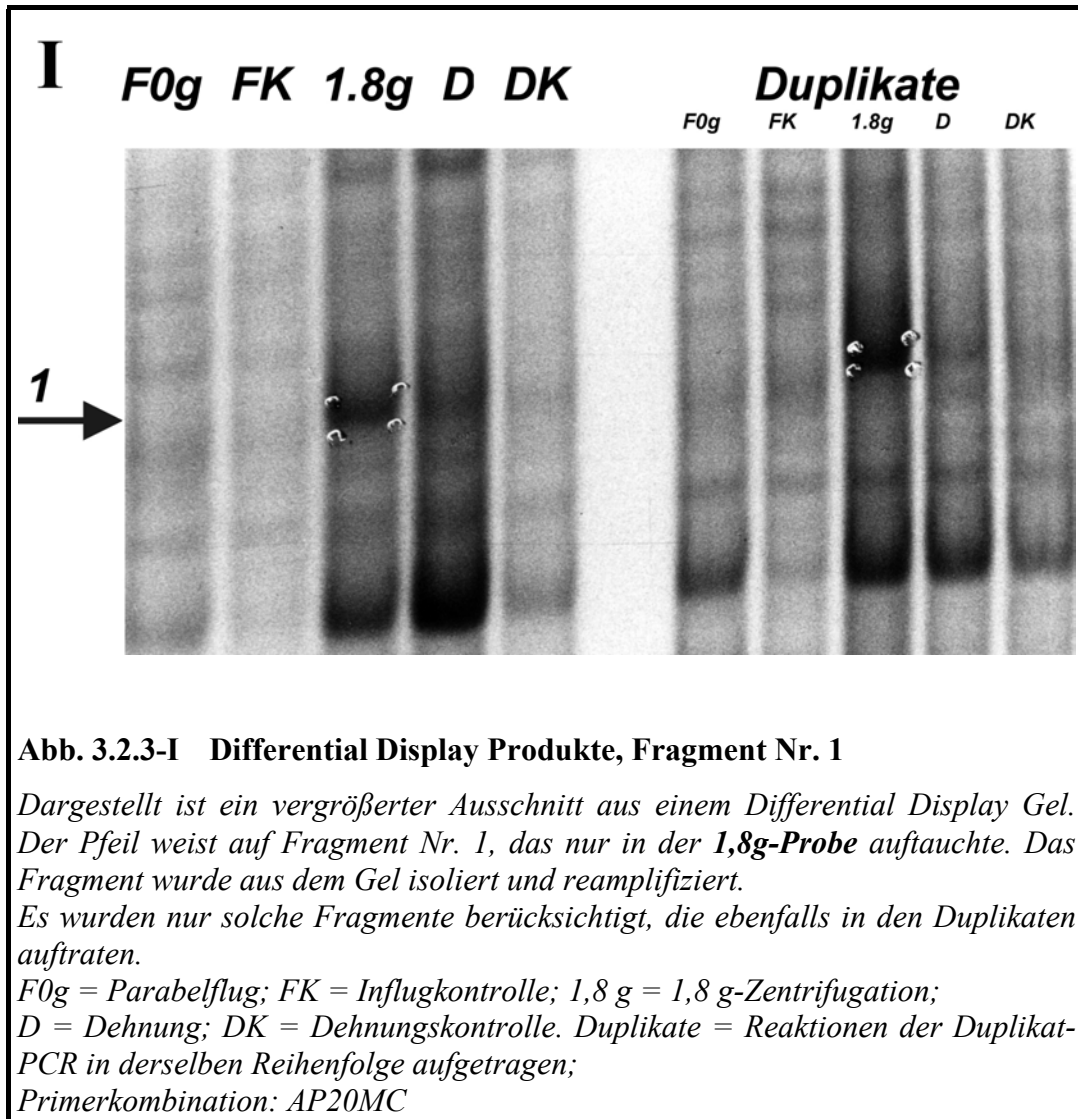


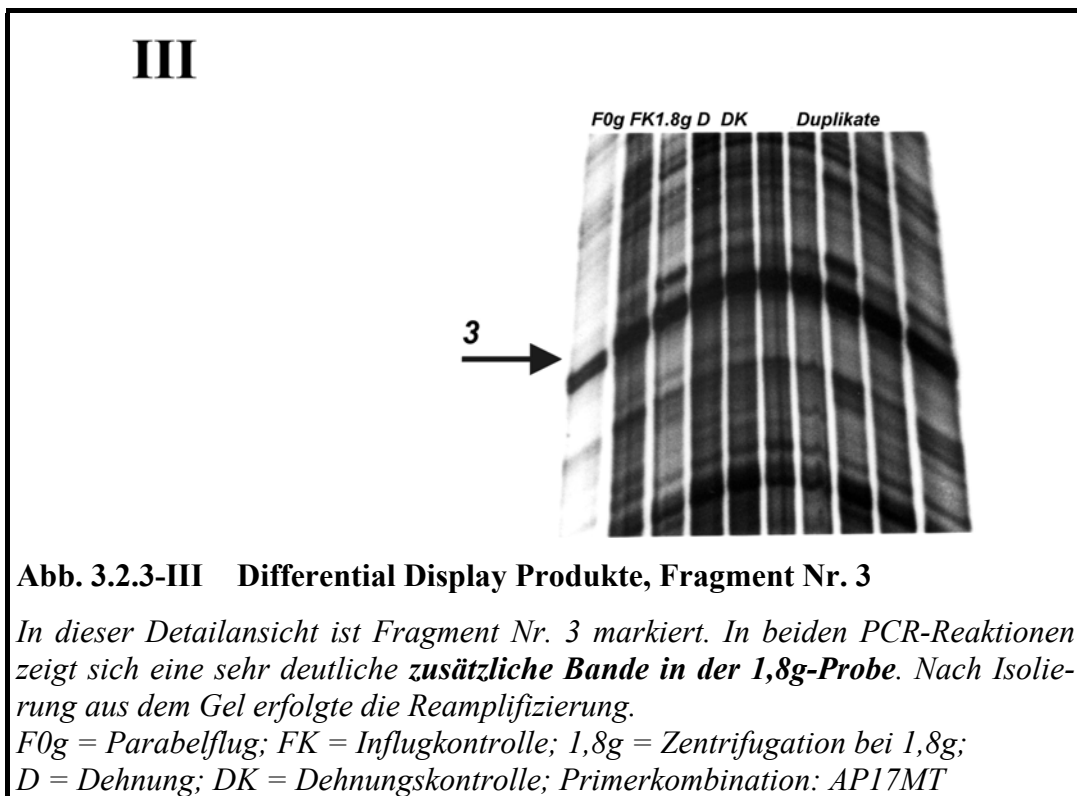
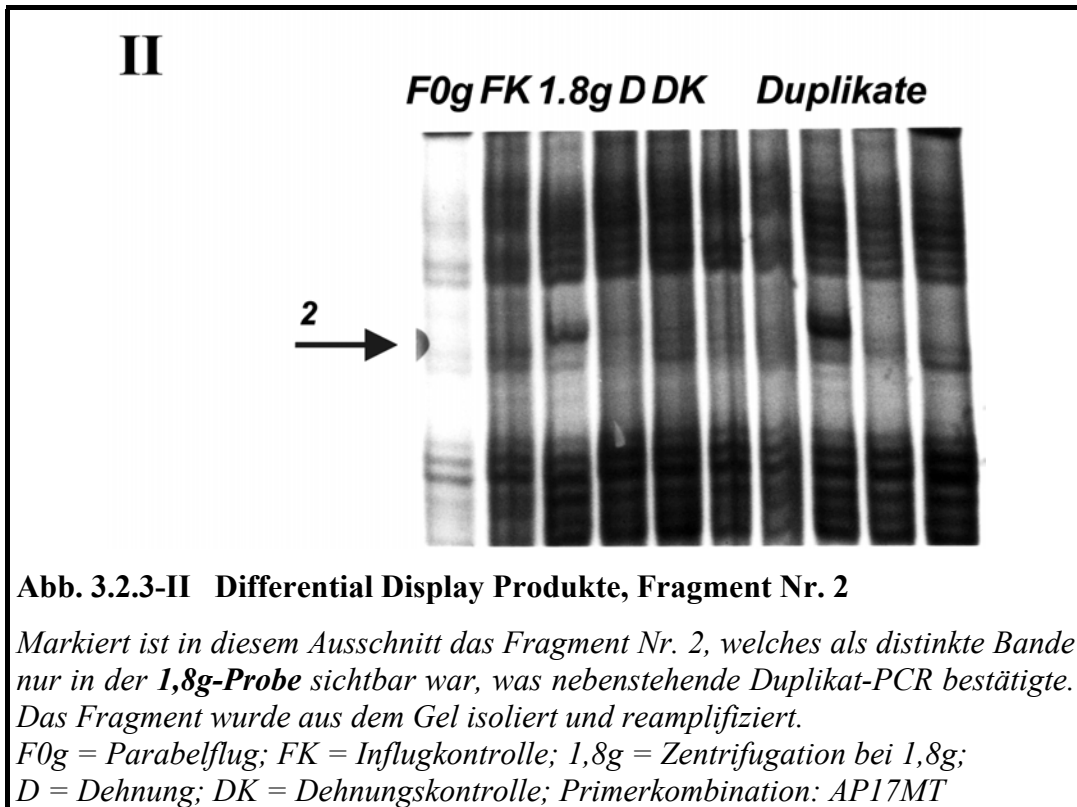
Abb. 3.2.3-1 Differential Display-Gel

Die Autoradiographie eines Differential Display-Gels der Primerkombinationen AP17MT, AP18MT und AP19MT ist hier repräsentativ für alle durchgeführten Experimente dargestellt. Die zu vergleichenden Proben sind jeweils parallel aufgetragen, daneben die Proben aus der Duplikat-PCR.

Die radioaktiv markierten (^{33}P -dATP) PCR-Amplifikate wurden in einer 5 %igen Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (s. Pkt. 2.4.4.3). F0g = Parabelflug; FK = Influgkontrolle; 1,8g = Zentrifugation bei 1,8g; D = Dehnung; DK = Dehnungskontrolle

Beim Vergleich der Bandenmuster der 20 Primerkombinationen fielen 9 differierende Fragmente in den Gelen auf, die in den folgenden Gelausschnitten dargestellt sind.





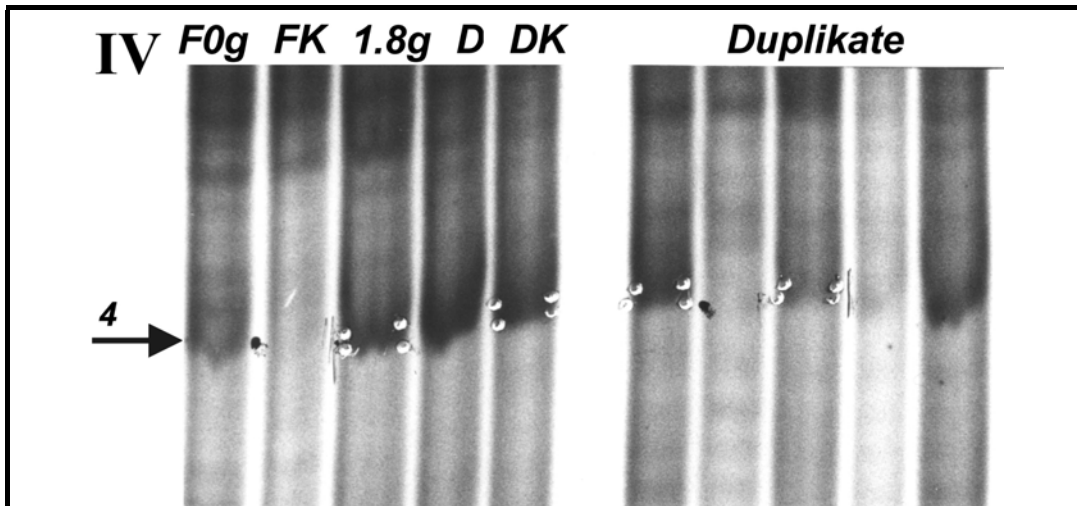


Abb. 3.2.3-IV Differential Display Produkte, Fragment Nr. 4

Dargestellt ist ein Gelausschnitt, in dem in der **Influgkontrollprobe** im Unterschied zu allen anderen Proben **keine Bande** sichtbar war.

Sichtbare Banden wurden als Fragment Nr. 4 isoliert. Die weißen Punkte auf dem Gel zeigen die Markierung auf dem Röntgenfilm zur Isolierung aus dem Gel an. Das Fragment wurde anschließend reamplifiziert und subkloniert.

F0g = Parabelflug; FK = Influgkontrolle; 1,8g = Zentrifugation bei 1,8g; D = Dehnung; DK = Dehnungskontrolle; Primerkombination: AP17MC

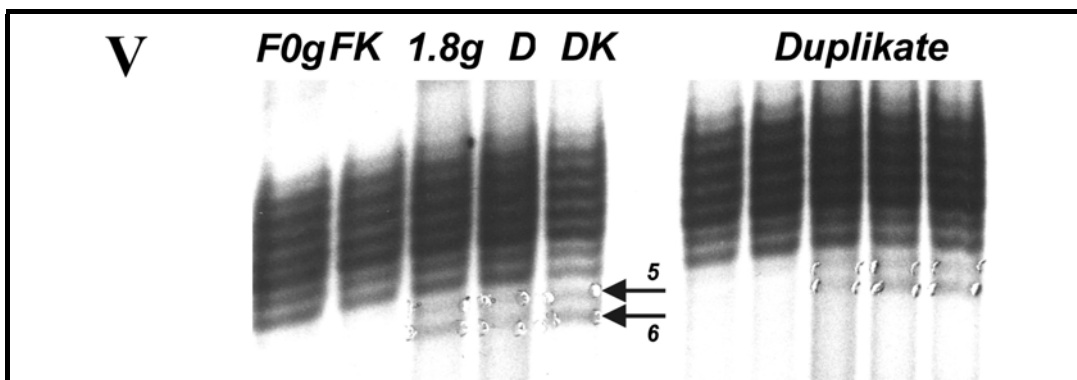


Abb. 3.2.3-V Differential Display Produkte, Fragmente Nr.5 und Nr.6

Der Vergleich der 5 Proben zeigt 2 **zusätzliche Banden** in den Proben **1,8g, D und DK**. Die als Fragmente Nr. 5 und Nr. 6 bezifferten Banden wurden aus dem Gel isoliert und reamplifiziert.

F0g = Parabelflug; FK = Influgkontrolle; 1,8g = Zentrifugation bei 1,8g; D = Dehnung; DK = Dehnungskontrolle; Primerkombination: AP20MC

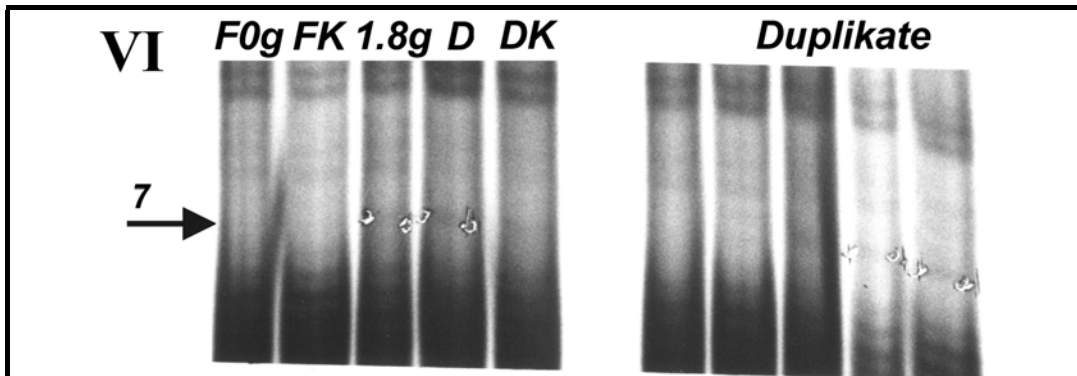


Abb. 3.2.3-VI Differential Display Produkte, Fragment Nr. 7

Der Pfeil zeigt auf eine schmale Bande, die nur in der 1,8g-, D- und DK-Probe auftaucht. Das Fragment Nr. 7 wurde aus dem Gel isoliert und reamplifiziert.

F0g = Parabelflug; FK = Influgkontrolle; 1,8g = Zentrifugation bei 1,8 g; D = Dehnung; DK = Dehnungskontrolle; Primerkombination: AP16MC.

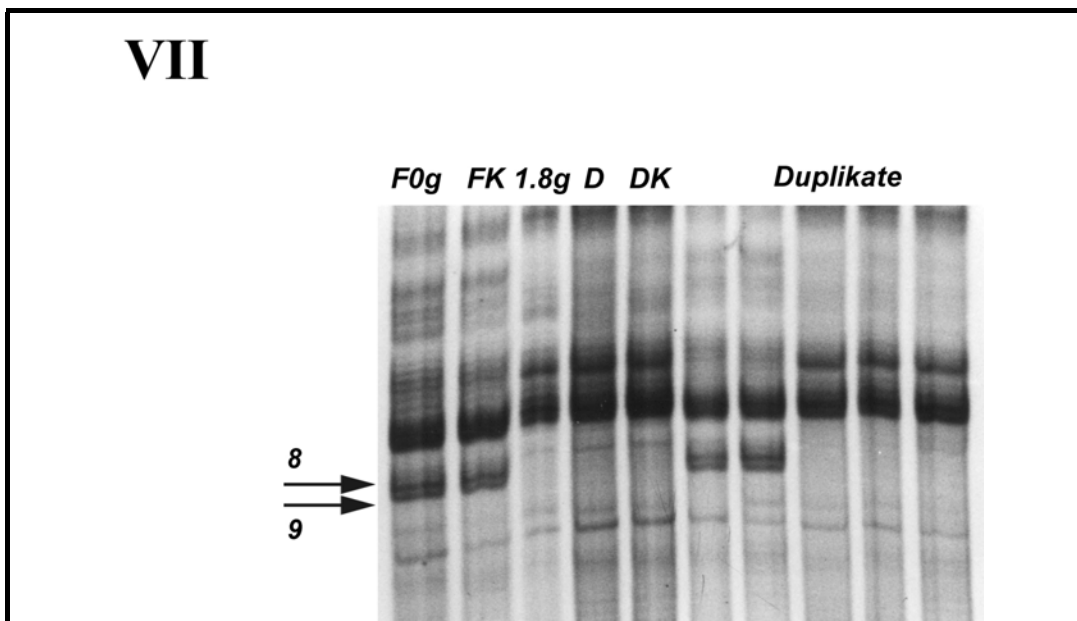


Abb. 3.2.3-VII Differential Display Produkte, Fragmente Nr. 8 und 9

*Dargestellt sind die Fragmente Nr. 8 und Nr. 9. Beide sind als deutliche **zusätzliche Banden in der Probe F0g und FK** erkennbar. Nebestehende Duplikat-PCR bestätigt dies. Die Banden wurden aufgrund ihrer räumlichen Nähe auf dem Gel knapp ausgeschnitten und reamplifiziert.*

0g = Parabelflug; FK = Influgkontrolle; 1,8g = Zentrifugation bei 1,8g; D = Dehnung; DK = Dehnungskontrolle; Primerkombination: AP 18MT

Es wurden insgesamt 9 differierende Fragmente entdeckt, die im Verlauf noch genauer charakterisiert und überprüft wurden. Zusammenfassend betrachtet ergab die Analyse des Differential Displays:

1. Es zeigten sich auffällige Unterschiede zwischen den Flugproben (F0g und FK) und den Laborproben (1,8g, D und DK), wobei 2 Fragmente (Fragment Nr. 8 und Nr. 9) nur in den Flugproben und 3 Fragmente (Fragmente Nr. 5, 6 und 7) nur in den Laborproben sichtbar waren.
2. Die 1,8 g-Probe wies 3 zusätzliche Banden auf (Fragmente Nr. 1, 2 und 3).
3. In der Influgkontrolle (FK) fehlte eine Bande im Vergleich zu allen anderen Proben (Fragment Nr. 4). Weitere Unterschiede konnten jedoch im Vergleich von Parabelflugprobe zu Influgkontrolle nicht detektiert werden.
4. Zwischen der Dehnungsprobe (D) und der Dehnungskontrolle (DK) zeigten sich *keine* Unterschiede im Bandenmuster.

3.2.4. Isolierung und Reamplifizierung von differierenden Fragmenten

Zur Isolierung der Fragmente wurde die Autoradiographie exakt deckungsgleich auf das Gel aufgebracht und die Banden mit einem sterilen Skalpell knapp aus dem Gel geschnitten, mit 1 µl sterilem H₂O aufgenommen und direkt für eine erneute PCR-Reaktion zur Reamplifizierung eingesetzt, wobei jeweils das gleiche Primerpaar wie in der originalen PCR verwendet wurde, jedoch mit einer erhöhten dNTP-Konzentration (20 µM) und in Abwesenheit radioaktiv markierter Nukleotide (s. Pkt. 2.4.4.4). Die PCR-Produkte wurden in einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt (s. Pkt. 2.4.3.2) und aus dem Gel extrahiert (s. Pkt. 2.4.3.3). Die Geleluate wurden anschließend zur Ligation eingesetzt.

Folgende Abbildung zeigt die reamplifizierten Fragmente (Abb. 3.2.4-1).

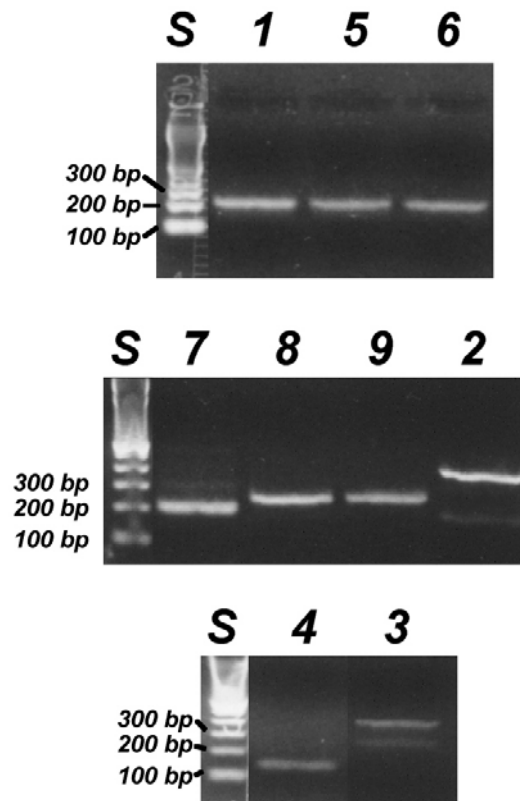


Abb. 3.2.4-1 Reamplifizierte Differential Display Produkte im Agarosegel

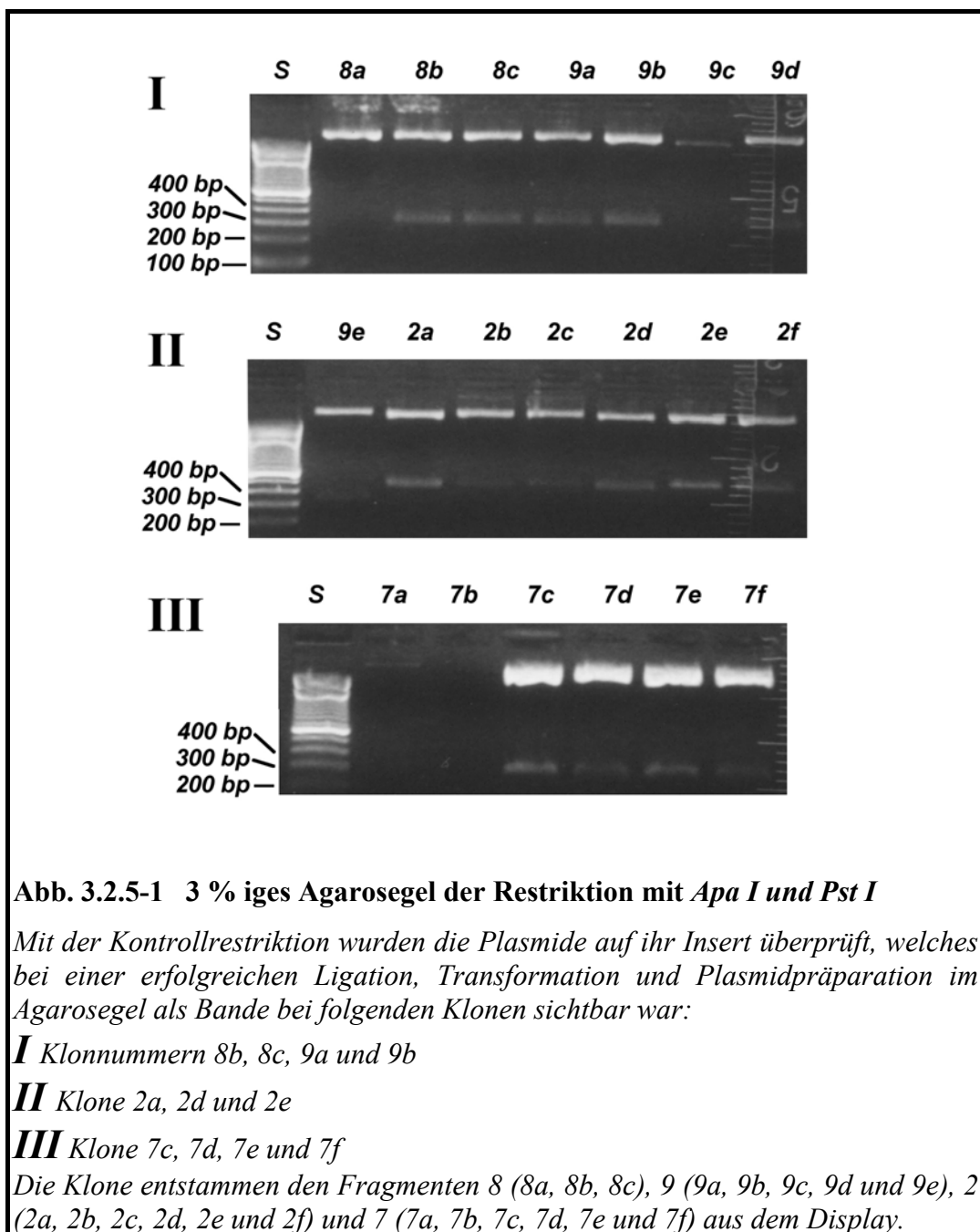
Die aus dem Differential Display Gel isolierten Fragmente wurden mit derselben Primerkombination wie in der Original-PCR reamplifiziert und in einem 3 % igen Agarosegel separiert. Mit dem zusätzlich aufgetragenen Standard wurde die Fragmentgröße mit den Fragmenten auf den Differential Display Gelen verglichen. Die Numerierung der Fragmente entspricht denen der Abb. 3.2.3-I-VII.

3.2.5. Subklonierung, Transformation und Minipräparation

Die aus dem Gel extrahierten cDNA-Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T ligiert (s. Pkt. 2.4.5) und in kompetente *E. coli* transformiert (s. Pkt. 2.4.6.2). Per Blau-Weiß-Screening wurden die positiven Kolonien selektiert und jeweils 10 positive Klone in einer 5 ml ÜN-Kultur bei 37 °C für eine Minipräparation herangezogen (s. Pkt. 2.4.7). Die Minipräparation ermöglichte die qualitative Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*.

Eine Restriktionskontrolle diente zur Überprüfung der Ligation (s. Pkt. 2.4.7.1). Hierzu wurde das cDNA-Insert unter Verwendung der Restrikti-

onsenzyme *Apa* I und *Pst* I herausgeschnitten, deren Erkennungssequenzen flankierend zum Insert lokalisiert sind. Das Reaktionsprodukt wurde in einem 3 %igen Agarosegel separiert. Mittels eines zusätzlich aufgetragenen Standards konnte die ungefähre Größe abgeschätzt und mit den PCR-Produkten auf dem Display verglichen werden (s. Abb.3.2.5-1 und Abb. 3.2.5-2).



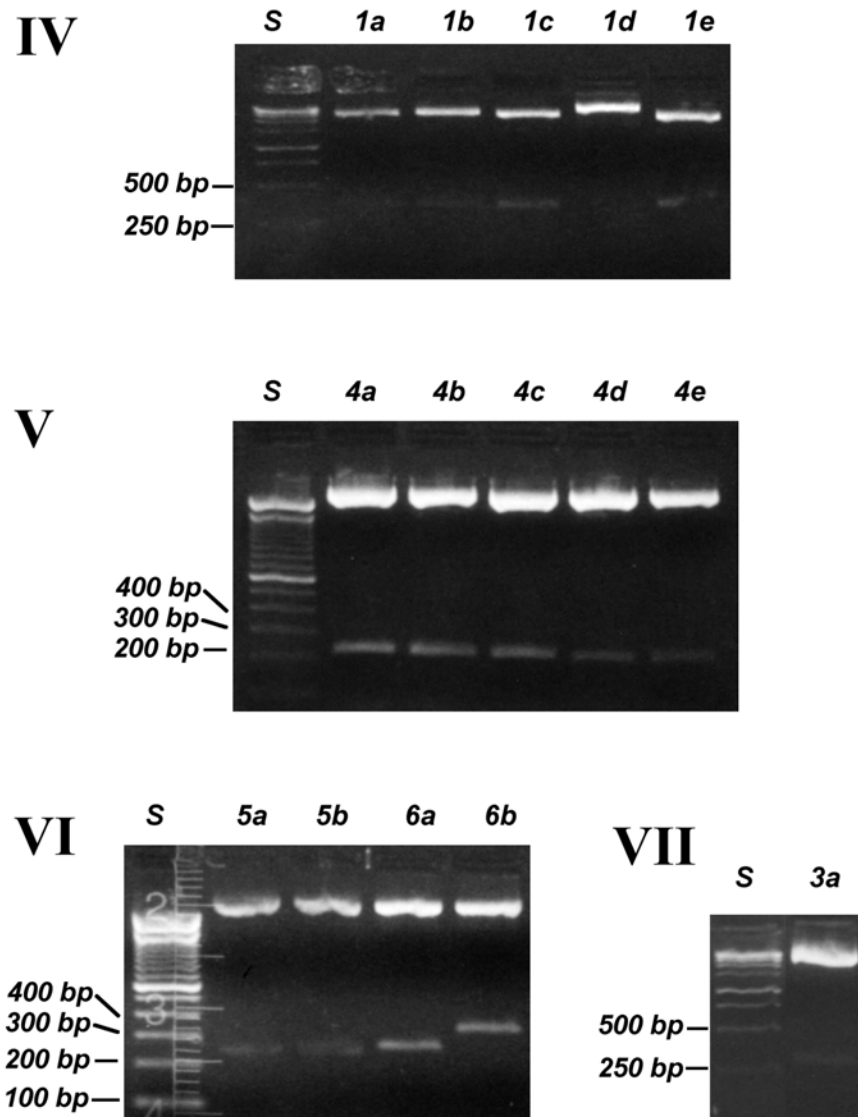


Abb. 3.2.5-2 3 %iges Agarosegel der Restriktion mit *Apa I* und *Pst I*

Mit der Kontrollrestriktion wurden die Plasmide auf ihr Insert überprüft, welches bei einer erfolgreichen Ligation, Transformation und Plasmidpräparation im Agarosegel als Bande bei folgenden Klonen sichtbar war:

IV Klonnummern 1b, 1c und 1e

V Klonnummern 4a, 4b, 4c, 4d und 4e

VI Klonnummern 5a, 5b, 6a und 6b

VII Klonnummer 3a

Die Klone entstammen den Fragmenten 1 (1a-1e), 4 (4a-e), 5 (5a und 5b), 6 (6a und 6b) und 3 (3a) aus dem Display.

Die Eluate der Minipräparation, die in der Restriktion ein Insert aufwiesen, wurden anschließend für die weiteren Verfahren der Reverse Northern Analyse, der Northern Blot Analyse und der Sequenzierung verwendet.

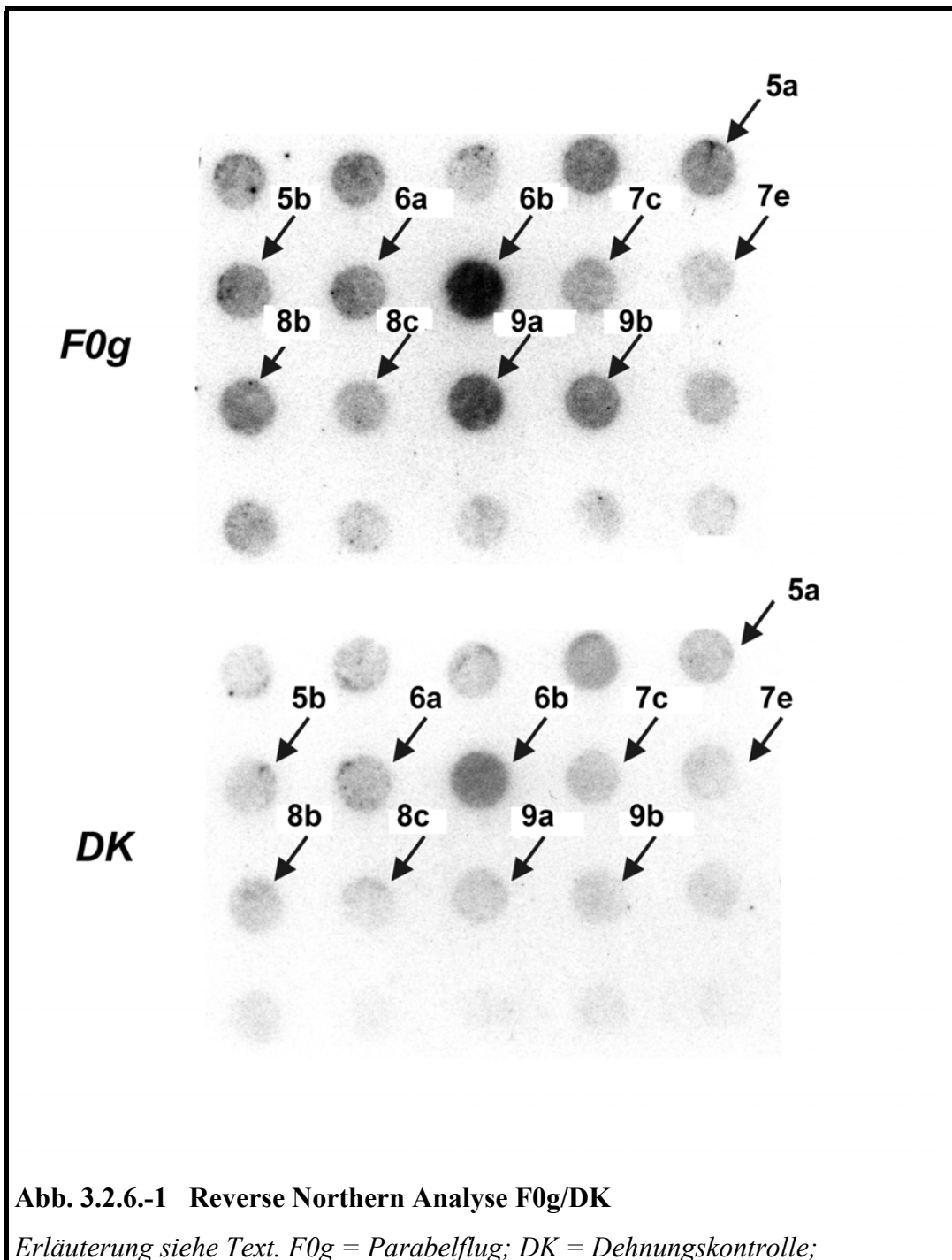
3.2.6. Reverse Northern Analyse

Zur Überprüfung der cDNA-Sequenzen der differentiell exprimierten Gene aus dem Differential Display wurde die Reverse Northern Analyse durchgeführt. Mit einer vergleichbar geringen Menge RNA (20 µg) kann eine Vielzahl von cDNA-Fragmenten in einem Versuchsansatz untersucht werden.

Zunächst wurden die durch Subklonierung, Transformation und Minipräparation gewonnenen cDNA-Fragmente, die in der Restriktion ein Insert aufwiesen (s. Abb. 3.2.5-1 und Abb. 3.2.5-2) per PCR mit flankierenden pGEM Primersequenzen (SP6 ,T7) amplifiziert und mit einer Dot Blot Apparatur auf eine Nylonmembran transferiert (s. Pkt. 2.4.9.1). Im folgenden wird die Bezeichnung der amplifizierten Fragmente aus Abbildung 3.2.5-1 und 3.2.5-2 beibehalten.

Zur Herstellung der Sonden wurden die zu vergleichenden RNA-Proben mit ^{32}P -dCTP über eine Reverse Transkription radioaktiv markiert (s. Pkt. 2.4.9). Das Sondenmaterial wurde aufgereinigt (s. Pkt. 2.4.8.2) und ÜN mit jeweils einer präparierten Membran hybridisiert (s. Pkt. 2.4.9.2). Anschließend wurden die Membranen gewaschen, um nicht hybridisiertes Sondenmaterial vom Filter zu entfernen. Die Exposition auf einem Röntgenfilm erfolgte für 3 Tage.

Folgende Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Reversen Northern Analyse (Abb. 3.2.6-1 und 2).



In einem ersten Dot Blot Verfahren (s. Abb. 3.2.6-1) wurden die Fragmente überprüft, die auf dem Display entweder nur in den Flugproben (Fragment Nr. 8 und Nr. 9; s. Abb. 3.2.3-VII) oder nur in den Laborproben erkennbar waren (Fragmente Nr. 5, 6 und 7; s. Abb. 3.2.3-V-VI). Die Filter wurden an korrespondierenden Stellen mit den amplifizierten Fragmenten

(5a,b; 6a,b; 7c,e; 8b,c; 9a,b) beschickt und nachfolgend mit radioaktiv markierten Sonden aus dem Flug (hier F0g) und aus Laborexperimenten (hier DK) hybridisiert (s. Pkt. 2.4.9.1 und 2.4.9.2). Die Intensität der korrespondierenden Dots wurde auf der Autoradiographie verglichen, wobei auffiel, daß der Filter, der mit cDNA aus Laborproben hybridisiert wurde, insgesamt eine schwächere Intensität aufwies. Daher wurden die Intensitäten optisch densitometrisch erfaßt und die relativen Intensitätsunterschiede bestimmt. Dabei ließen sich drei der fünf untersuchten Fragmente im Dot Blot Verfahren bestätigen:

Fragmente	Dot Blot Auswertung	Bestätigung
5(a, b) (L)	DK:F0g =0.85	-
6(a, b) (L)	DK:F0g =1.06	-
7(c, e) (L)	DK:F0g =1.27	+
8(b, c) (F)	F0g:DK =1.33	+
9(a, b) (F)	F0g:DK =1.92	+

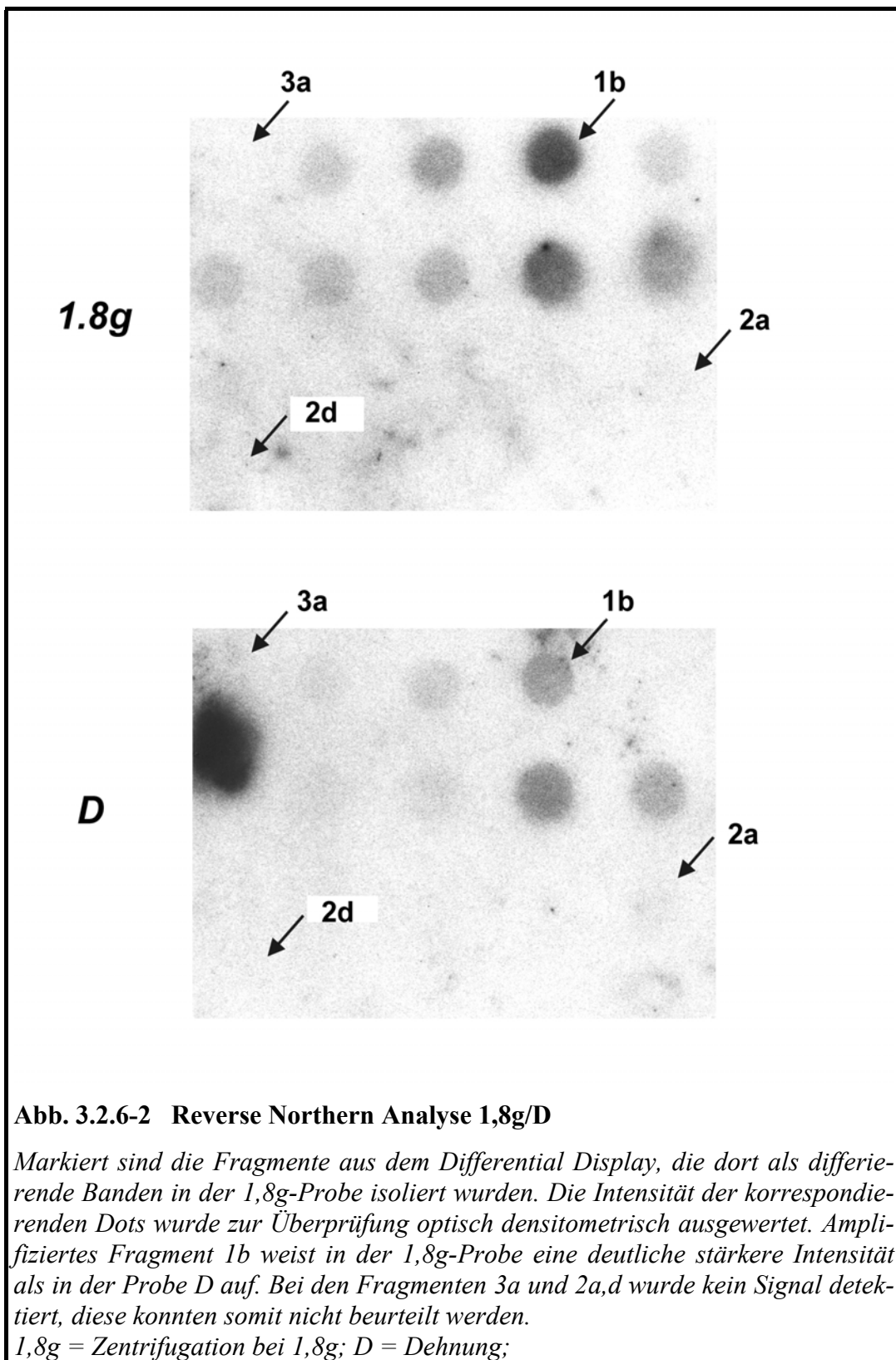
Tabelle 3.2.6-1 Aufstellung der Analyse der Signalintensitäten des in Abb. 3.2.6-1 dargestellten Dot Blots und Vergleich mit den Ergebnissen aus dem Differential Display

Die Intensität der jeweiligen Signale der Fragmente von F0g wurden mit denen von DK verglichen, densitometrisch erfaßt und das Verhältnis dargestellt. Fragmentbezeichnung: die mit F gekennzeichneten Fragmente wurden aus Flugproben (F0g, FK) isoliert, mit L wurden die aus Laborproben (1,8g, D, DK) isolierten Fragmente bezeichnet. F0g = Parabelflug; DK = Dehnungskontrolle;

+ bedeutet Bestätigung, - bedeutet keine Bestätigung.

Mit einem weiteren Dot Blot Verfahren wurden die Fragmente Nr. 1, 2 und 3 (s. Abb. 3.2.3-I-III) überprüft, die als differierende Banden in der 1,8g-Probe entdeckt wurden. Hierzu wurde je ein Nylonfilter mit radioaktiv markierter Sonde der 1,8g-Probe und einer Kontrollprobe (hier D = Dehnung)

hybridisiert. Die folgende Abbildung (Abb. 3.2.6-2) zeigt die Autoradiographie dieser Dot-Blot Hybridisierung.



In diesem Dot Blot konnte ein Fragment (Nr. 1(b)) bestätigt werden, die relative Intensität betrug in der 1,8g-Probe 138 % des korrespondierenden Fragments in der Probe D (D = Dehnung). Die Fragmente Nr. 3(a) und 2(a,d) konnten aufgrund fehlender Signale nicht beurteilt werden.

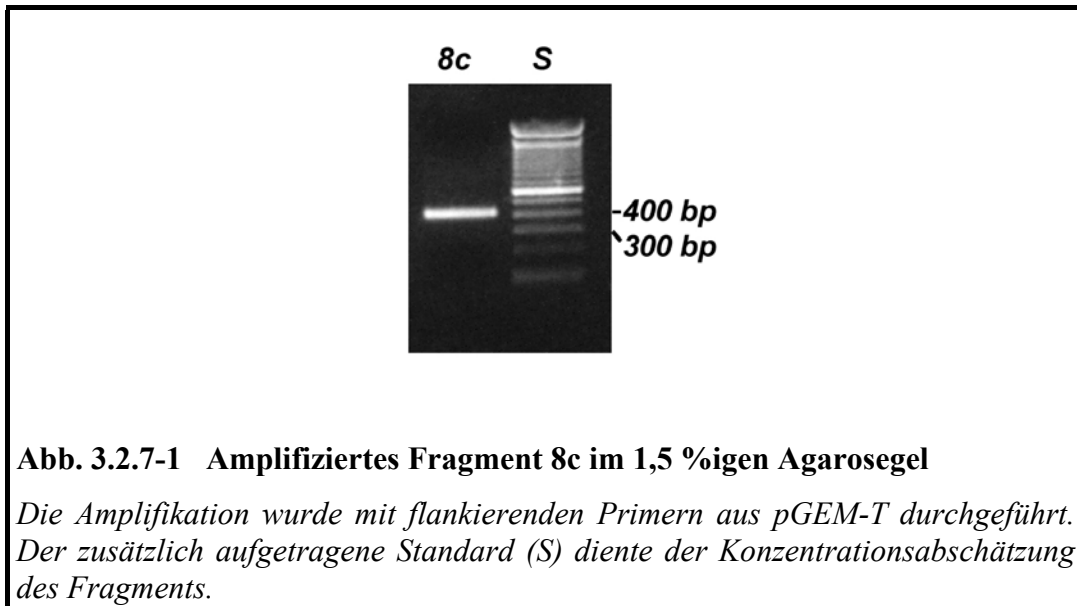
Dieses Ergebnis bestätigte sich in einem weiteren Dot Blot Verfahren (ohne Abbildung) mit denselben cDNA-Proben.

3.2.7. Northern Blot Analyse

Eine Northern Blot Analyse wurde mit Fragment 8(c) durchgeführt, welches zuvor im Reversen Northern Verfahren bestätigt werden konnte (s. Pkt. 3.2.6). Die Methode ist durch eine hohe Sensitivität charakterisiert und erlaubt die Ermittlung der Größe der kompletten cDNA. Allerdings wird für eine Northern Blot Analyse eine relativ große RNA-Menge von 20 µg benötigt. Daher wurde ein Fragment ausgewählt, welches als deutliches Signal im Dot Blot bestätigt wurde.

Jeweils 20 µg der zu vergleichenden RNA-Proben wurden in einem 1 %igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen separiert (s. Pkt. 2.4.3.1) und auf eine Nylonmembran transferiert (s. Pkt. 2.4.8). Das Plasmid des Fragments 8c (s. Abb. 3.2.5-1) wurde zur Präparation der DNA-Sonde mit flankierenden Primern aus pGEM-T per PCR amplifiziert.

In Abb. 3.2.7-1 ist das amplifizierte DNA-Fragment dargestellt.



Nach Aufreinigung des DNA-Fragmentes per Gelextraktion (s. Pkt. 2.4.3.3) wurden 50 ng DNA radioaktiv mit α - ^{32}P -dCTP markiert (s. Pkt. 2.4.8.1). Die Hybridisierung erfolgte entsprechend dem Protokoll in Abschnitt 2.4.8.3. Nach Prähybridisierung wurde die DNA-Sonde zur Hybridisierung zur Membran gegeben und über Nacht bei 42 °C inkubiert. Nach entsprechenden Waschvorgängen erfolgte die Autoradiographie.

Nach 3 Wochen Expositionszeit konnte kein Signal auf dem Röntgenfilm detektiert werden.

3.2.8. Sequenzierungen

Die aus dem Differential Display stammenden cDNA-Fragmente wurden als Fremdauftrag in einem anderen Labor sequenziert.

Die gewonnenen Sequenzen wurden am NCBI (National Center for Biotechnology Information am National Institutes of Health (NIH), USA) unter der URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> mit Hilfe des BLAST Servers Ver. 2.0 auf Homologien zur Sequenzdatenbank GenBank (dbEST, nr) überprüft.

Aus den 9 ermittelten Sequenzen konnten 2 cDNA-Fragmente signifikanten Homologien zugeordnet werden. Im folgenden werden die Sequenzen dargestellt.

Fragment Nr. 1

```

TTTTTTTTTTTTTGGCTAAACCAGATTTTTTGTTCCTTTCTAGTGATTCATGTTT
ATGAAGAGAGTTGAGTTTAACAATCCTAGTTTTTAAAAGAACTATTTAATGTAA
AATATTCTACTTGTCATTCAGATATTATGTATATCTTCTATGGCCTTTATTCTGT
ACTTTTAAATGTACATATGTCTGTCTGTGTGATTTGTCTATTTCACTGGTTCAAA
AACAAAACATCGAAAGGCTTATGCCAAATGGAAGATAGAATATAAAATAAAATAT
TACTTGTATATTGGT

```

Fragment Nr. 1 zeigte über die gesamte Länge (300bp) eine 93 %ige Homologie zum humanen *Wnt5a* (wingless-type MMTV integration site family member 5A). *Wnt* Gene kodieren eine Familie hochkonservierter Glykoproteine, denen eine Rolle bei rezeptorvermittelten interzellulären Signalvorgängen während der Embryogenese zugeschrieben wird. *Wnt5A* wurde von Clark et al. kloniert (1993).

```

ref|NM_003392.1|WNT5A| Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family,
member 5A

```

```

(WNT5A) mRNA >gi|348917|gb|L20861|HUMWNT5A Homo sapiens
proto-oncogene (Wnt-5a) mRNA, complete cds.
Length = 4114

```

```

Score = 307 bits (155), Expect = 8e-82
Identities = 211/226 (93%), Gaps = 4/226 (1%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 30   ttgttcctttctagtgattcatgtttatgaagagagttgagtttaacaatcctagttttt 89
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 3892 ttgttccttttttagtgactcatgtttatgaagagagttgagtttaacaatcctagctttt 3951

```

```

Query: 90   aaaagaaactatTTAATGTAAATATTCTACTTGTCAATTCAGATATTATGTATATCTTCT 149
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 3952 aaaagaaactatTTAATGTAAATATTCTACATGTCATTCAGATATTATGTATATCTTCT 4011

```

```

Query: 150  atggcctttattctgtactttttaatgtacatatgtctgtc-tgtgtgatttgcctattt 208
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 4012 a--gcctttattctgtac-ttttaatgtacatatTTTCTGTCTTGCCTGATTGTATATTT 4068

```

```

Query: 209  cactggttcaaaaacaaacatcgaaaggcttatgccaaatggaag 254
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 4069 cactggttcaaaaacaaacatcgaaaggcttatccaaatggaag 4114

```

Als ‚Query‘ wird in dieser Darstellung die Sequenz der aus dem Differential Display erhaltenen Sequenzen bezeichnet, als ‚Sbjct.‘ die aus der Sequenzdatenbank stammende homologe Sequenz.

Fragment Nr. 2

TTTTTTTTTTTTTTGTACANGGGTTTACGGGTCGGGGTAAGGGAGGTTTCACAC
ATCCTCCTCTGNAGAAGCCCAAATGATGCGAATGGAGAGCGGTGTTTTGCGCGGT
CACGAGCANAGGGCAGCAGTGCCCGCGGGGTCTCGCAAAGTCCAGGAAGCGGAGG
AACTCGGTTCCCGGGGGNCCCAAGCCCACCTGGGGATCAGGAATTCCCGGCTGGG
TGNGGAANGTGGCATGCAACTGGGCAAAGGANATTTGGAGGTACTTTAAAATTAA
ACACAGCAAATCTGGGANTCTGCTGAAATTTTCCAGGNAACNAAAAATCATATGC
ANAACCACTATTTNGAATCCTGNNATGTGCTGTGCTGTGCTNTGCNGTNCNTAAC
CTAAATCCCTTACAATCANNAGTGCGGCCNCNNGCAATTNNNCAANNTGGNAANA
CTCCCAACCN

Fragment Nr. 3

TGTGATCGGACAGTGTGGTTTAATTTATTTAACTGGAATCCTTGCTCTTGTTTCGT
GATTAAACTGTGTACAGATGTCATAAGAGGTTGGGTCTCAAGTTTTCATAAAATA
GATGTGATTTTAGTGTTTCAGAGTTCTTTCTCTTGTTTAAAGGAATGCTTTCCTAA
TGCCAATAAATGGCCTAACTGCTTTTTAGGTGCAAAAAAAAAAAAAA

Fragment Nr. 4

TGCAGGAGTCGGACATGATGTAGCAACTAAACAGCACCAAAGCTATAGTCACTAT
CTTTTCACATCCTCATTTTATGTGTCCAGTAAGGCATACCAGATTCAGCATATTC
ANAGGAAAATTTTATCCGCCCCACCCACCTCTGCAAAAAAAAAAAAAA

Fragment Nr. 5

TTTTTTTTTTTTTTGCCCTAAAAAGCAGTTATGGCCATTTATNGGGCATNAGGA
AAGCATTCCTTTAAACAAGGAGAAAGAACTCTGNAACACTAAAATCACATCTATT
TTATGNNAACTTGTAGACCAACCTCTATGACATCTGTCCACAGTTTAATCACGAA
CAAGAGCAAGGATTCCAGTTNAATAAATTAAACCACACTGTCCGATCACA

Fragment Nr. 6

CGCCGGCTCCGGCCGCCATGGCCGCANGATTGTGATCGGACTTGTGNTTTAATTT
ATTTAACTGGAATCCTTGCTCATGTTTCGTGATTATGCTGTGTACAGATGTCATAN
NAGGTTGTGTCTCAAGTTTTCATAAAATAGNTGTGATTTTAGTGTTTCAGAGTTCT
TTCTCTTGTTTAAAGGAATGCTTTCCTAATGCCAATAAATGGCNNAANTGCTTTT
TAGGTGCAAAAAAAAAAAAAA

Fragment Nr. 7

TCGTCAGTGACACTCTCAGTCCTCCAGCATCTCAACTCGCGAGTCTGTGAAGATT
 CGGGGAACCGTTGAGAATAAGGTCCCTGGCCTACACTCTCCTTGNAAGTTGCCTC
 CAAGGGGGTGGCTGCGGGGTCGGTGGGCTGTCAGGAGGCTGCTCTGGGGTCGCCC
 CGTATGTTCTATGAACACAAATAAACTTGATTTACTGTCAGCAAAAAAAAAAAAAA
 A

Fragment Nr. 7 zeigte eine partielle Homologie zur humanen DIF-2 Sequenz (Differentiation-Dependent gene 2), welches ursprünglich aus Monozyten isoliert wurde. Es wird während des Differenzierungsvorganges supprimiert (*Pietzsch et al, 1997*).

```
emb|Y14551|HSDIF2      Homo      sapiens      mRNA      for      DIF-2      protein
>gi|4503328|ref|NM_003897.1|DIF2|
      Homo      sapiens      DIFFERENTIATION-DEPENDENT      GENE      2      (DIF2)      mRNA
Length = 1230
Score = 60.0 bits (30), Expect = 2e-07
Identities = 36/38 (94%)
Strand = Plus / Plus

Query: 167  gtatgttctatgaacacaaataaaacttgatttactgtc 204
          |||
Sbjct: 1178 gtatgttctgtgaacacaaataaaattgatttactgtc 1215
Score = 38.2 bits (19), Expect = 0.68
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 20  tcctccagcatctcaactc 38
          |||
Sbjct: 1011 tcctccagcatctcaactc 1029
```

Als ‚Query‘ wird in diesem Vergleich die Sequenz der aus dem Differential Display erhaltenen Sequenzen bezeichnet, als ‚Sbjct.‘ die aus der Sequenzdatenbank stammende homologe Sequenz.

Fragment Nr. 8

GATTCTGAGCTAGGGAAGGACAGGAAGGAAGGCCTTGTTTATGGTTTTAAGATAT
 TACTTGGCCAACACTGACAGTTCTCCAGAAAAACAGCACATCTCAAAACAAGTA
 CTCGGGAATAAATGCTGTGAAAAGGTATTTTATAACAACCTTTCATCTTTTAAAA
 TGTTTTGTGTAGGTTTTCTTTCTCTCATATCNCAAGTGCAATGT

Fragment Nr. 9

GGAAGGACAGGAAGGAAGGCCTTGTTTATGGTTTTAAGATATTACTTGGCCAACA
CTGACAGTTCTCCAGAAAAACAGCACATCTCAAAACAAGTACTCCTGGANTAAA
TGCTGTGAAAAGGTATTTTATAACAACTTTCATCTTTTAAAATGTTTTGTGTAGG
TTTTCCTTTCTCTCATATCTCAAGTGCAATGTATAAAATTCANCTTTTCACATGT
ACAATAAACTGTTATCACAAAAAAAAAAAAAAAA

4. Diskussion

Knochen ist ein plastisches, dynamisches Gewebe, das ständig unter hormoneller Kontrolle und körperlichen Belastungen auf- und abgebaut wird. Beispielsweise führt eine andauernde Entlastung durch Immobilisierung und Bettlägrigkeit zu Knochenverlusten und erhöhter Frakturgefährdung. Auch bei Astronauten, die längere Zeit schwerelosen Bedingungen ausgesetzt sind, erfolgt ein Knochenverlust, der durchschnittlich 1-2 % pro Monat beträgt. Wie bereits ausführlich in der Einleitung beschrieben, gibt es viele experimentelle Ansätze zur Untersuchung der Auswirkung von Schwerelosigkeit auf Knochengewebe in vivo und in vitro. In den bisher durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, daß Knochenzellen unter schwerelosen Bedingungen auch Veränderungen hinsichtlich der Genexpression erfahren. Eine umfassende Genanalyse von unter Schwerelosigkeit kultivierten Knochenzellen, die zu einem verbesserten Verständnis zellulärer Mechanismen beitragen könnte, wurde bislang nicht durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen kurzer Phasen von Schwerelosigkeit, erzeugt durch ein Parabelflugmanöver (30 Parabeln mit je 25 Sekunden bei 0g), auf die Genexpression in primären bovinen Osteoblasten untersucht. Mit der Differential Display Methode wurde das Muster der Genexpression mit geeigneten Kontrollzellen verglichen. Durch die Wahl der Methode können sowohl aktivierte als auch supprimierte Gene detektiert werden. Die Entdeckung neuer Gene ist ebenfalls möglich.

Die Genanalyse wurde 3 Stunden nach Beginn der schwerelosen Bedingungen durchgeführt. Dies bietet die Möglichkeit der Untersuchung früher zellulärer Ereignisse, die wiederum Hinweise auf aktivierte Signalwege geben können.

4.1. Methodische Aspekte

4.1.1. Differential Display: Analyse differentieller Genexpression

Zur Analyse differentieller Genexpression wurden in den vergangenen Jahren neue Methoden entwickelt, darunter das EST-Sequencing (expressed sequenced tags), die Differential-Display Technik, die SAGE (serial analysis of gene gene expression) und die Microarray Hybridisierung. Die verschiedenen Methoden weisen spezifische Vor- und Nachteile auf, auf die in den Übersichtsartikeln von Carulli et al (1998) und Matz und Lukyanov (1998) näher eingegangen wird.

In dieser Arbeit fiel die Wahl der Methode zugunsten des Differential Display aus. Die Differential Display Methode - erstmals von Liang und Pardee (Liang und Pardee, 1992) beschrieben - beruht auf der Separation und Klonierung von mRNA durch Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion. Unterschiede in der Genexpression werden dabei durch differentielle Bandenmuster im Gel visualisiert. Die Methode ermöglicht die Darstellung und den Vergleich von 98 % der mRNA Species einer Zelle. Ein entscheidender Vorteil dieses Verfahrens ist der niedrige RNA Bedarf (100 ng) für eine Expressionsanalyse, da RNA aus Flugproben - aufgrund des hohen Aufwands - nur in begrenzter Menge vorliegt. Außerdem ermöglicht das Verfahren den simultanen Vergleich einer Vielzahl von Proben durch die parallele Darstellung der verschiedenen Proben in der Gelelektrophorese. Die Methode zeichnet sich weiterhin durch eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der Signale von Experiment zu Experiment aus und läßt sich mit einer Standardlaborausrüstung verhältnismäßig schnell durchführen. Eine Schwäche der Differential Display Methode ist die hohe Zahl sogenannter ‚falsch-positiver‘ Fragmente, verursacht durch artefizielle PCR-Produkte. In dieser Arbeit wurde versucht, die Anzahl ‚falsch-positiver‘ Signale zu reduzieren: von jeder PCR-Reaktion wurde eine Duplikat-PCR durchgeführt und anschließend wurden nur solche cDNA-Fragmente aus dem Gel zur Reamplifizierung isoliert, die in beiden Reaktionen ein deutliches Signal lieferten. Außerdem wurden auf der Autora-

diographie nur Fragmente nach dem „Alles-oder-Nichts“ berücksichtigt, d. h. es wurden nur klare, distinkte Banden isoliert, die in einer oder mehreren Spuren vorhanden waren und in den übrigen Spuren nicht auftraten.

In der durchgeführten Differential Display Analyse wurden insgesamt 9 cDNA-Fragmente isoliert, die auf eine differentielle Genexpression hinweisen.

Fragmente Nr. 1, 2 und 3 stammen aus der 1,8g-Probe, Fragment Nr. 8 und Nr. 9 aus Flugproben (Flugprobe F0g, Influgkontrollprobe FK) und Fragmente Nr. 5, 6 und 7 aus Laborproben (Zentrifugation bei 1,8g, Dehnung D, Dehnungskontrolle DK). Fragment Nr. 4 ließ sich in allen Proben außer der Influgkontrolle (FK) nachweisen (s. Abb. 3.2.3-I-VII).

4.1.2. Reverse Northern Analyse

Die Reverse Northern Analyse wurde durchgeführt, um die isolierten cDNA-Fragmente aus dem Differential Display zu überprüfen und somit die Anzahl ‚falsch positiver‘ Fragmente zu reduzieren (*Zhang et al, 1996*).

Mit 20 µg RNA konnte so eine Vielzahl von cDNA-Fragmenten überprüft werden (s. Abb. 3.2.6-1 und 3.2.6-2). Dies ermöglichte eine erhebliche Einsparung von RNA, die für eine vollständige Analyse isolierter Fragmente notwendig ist.

Vier Fragmente wurden auf diese Weise bestätigt (Fragmente Nr. 1, 7, 8 und 9). Zwei erwiesen sich als ‚falsch-positiv‘ (Fragment Nr. 5 und Nr. 6). Aufgrund zu schwacher Signalintensitäten konnten zwei weitere Fragmente nicht beurteilt werden (Fragment Nr. 2 und Nr. 3), was eine Limitierung dieser Methode verdeutlicht. Trotz dieser Limitierung ermöglicht die Reverse Northern Analyse eine vorläufige Fokussierung auf cDNA-Fragmente, die ein signifikantes Signal hinterlassen. Diese sollen in Folgeexperimenten überprüft werden.

4.1.3. Northern Blot Analyse

Das der Reversen Northern Blot Analyse nachfolgende Experiment zur genauen Überprüfung der Expression relevanter Gene stellte die Northern Blot Analyse dar. Aufgrund des hohen RNA-Bedarfs von 20 µg für eine Analyse wurde das Fragment Nr. 8c, welches zuvor als deutliches Signal in der Reversen Northern Analyse bestätigt werden konnte (s. Pkt. 3.2.6), als DNA-Sonde verwendet und mit RNA der verschiedenen Proben hybridisiert (s. Pkt. 3.2.7). Nach 3 Wochen Expositionszeit konnte jedoch kein Signal auf der Autoradiographie entdeckt werden. Möglicherweise lag das betreffende Gen als 'single-copy' Gen vor und konnte daher nicht detektiert werden. Zudem stammt die aus dem Differential Display isolierte cDNA aus der 3'-untranslatierten Region, die möglicherweise durch post-transkriptionale Modifikationen im betreffenden Gen prozessiert wird.

Um zukünftig dennoch eine Expressionsanalyse des betreffenden Gens vorzunehmen, stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen könnte durch die Verwendung eines mRNA Gels und nachfolgender Northern Analyse eine Amplifikation des Signals erreicht werden, wozu jedoch sehr große Mengen Gesamt RNA notwendig sind. Da RNA aus dem Parabellflug nur in begrenzter Menge vorliegt, ist dies nicht praktikabel. Alternativ könnte in Zukunft die volle Länge der cDNA zum Beispiel von Fragment 8 kloniert werden, um mit einer Sonde aus der codogenen Region die Wahrscheinlichkeit der Detektion in der Northern Blot Analyse zu erhöhen (5'-RACE oder cDNA "library screening").

4.1.4. Sequenzierung

Die ermittelten Sequenzen der Fragmente mit Längen zwischen 200 und 300 Basenpaaren wurden auf Homologien zur Sequenzdatenbank 'Gen-Bank' (s. Pkt. 3.2.8) untersucht.

Von den 9 ermittelten Sequenzen wiesen nur 2 Klone signifikante Homologien zu bekannten Sequenzen in der Datenbank auf.

Ein Grund für die niedrige Trefferquote findet sich vermutlich in der derzeitigen Verteilung der in 'GenBank' enthaltenen Sequenzinformationen verschiedener Spezies. Rund 56 % aller dort verfügbaren Sequenzinformationen sind humanen Ursprungs, mit hoher Häufigkeit sind ebenfalls Maus- und Ratten-DNA-Sequenzen enthalten. Der Anteil boviner Sequenzen ist relativ gering (*Benson et al, 2000*). Durch die Differential Display Technik werden ausschließlich Sequenzen aus den 3'-Enden von mRNAs isoliert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit noch im untranslatierten Bereich lokalisiert sind. Gerade in diesem Bereich finden sich besonders große Homologiedifferenzen zwischen den jeweiligen Spezies, was zum einen die nur partielle Homologie der Differential Display-Fragmente zu humanen Sequenzen und zum anderen möglicherweise das Fehlen von Sequenzinformationen eines relativ großen Anteils isolierter Fragmente erklärt. Daher wird möglicherweise erst die Generierung der kompletten cDNA-Sequenzen der verbliebenen Fragmente zu weiteren Identifizierungen führen.

Fragment Nr. 1 (isoliert aus der 1,8g-Probe) zeigte über die gesamte Länge (300 bp) eine 93 %ige Übereinstimmung mit dem humanen Wnt 5A (wingless-type MMTV integration site family member 5A). Somit kann davon ausgegangen werden, daß es sich hier um das bovine Wnt 5A handelt. Wnt Gene kodieren eine Familie hochkonservierter Glykoproteine, denen eine Rolle bei rezeptorvermittelten interzellulären Signalvorgängen während der Embryogenese zugeschrieben wird (*Nusse und Varmus, 1992*). Ferner führt die Sezernierung des Genprodukts von Wnt 5A über eine Aktivierung der Phospholipase C (*Slusarski et al, 1997*) oder der Proteinkinase C (*Sheldal et al, 1999*) zur Entstehung von Calciumsignalen. Zur Klärung einer möglichen Funktion in Osteoblasten muß zunächst die Expression in Northern Blot Analysen überprüft werden.

Fragment Nr. 7, welches aus Laborproben (Zentrifugation bei 1,8g, Dehnung und Dehnungskontrolle) isoliert wurde, zeigte eine partielle Homolo-

gie über 50 Basen zur humanen DIF-2 Sequenz (Differentiation-dependent gene 2). In Monozyten wird DIF-2 während der Differenzierung zu Makrophagen supprimiert (*Pietzsch et al, 1997*). Die genaue Funktion des Gens ist nicht bekannt. Da sich die Homologie aber nur über 50 Basenpaare erstreckt, ist es sehr fraglich, ob es sich bei dem Fragment um das bovine DIF-2 handelt. Eine genaue Identifizierung und weiterführende Charakterisierung ermöglicht erst die Klonierung der gesamten cDNA. Aus diesen Gründen kann eine mögliche Rolle von DIF-2 in Osteoblasten zu diesem Zeitpunkt nicht diskutiert werden.

4.2. Bewertung der Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der Genexpression in primären bovinen Osteoblasten, die der Schwerelosigkeit ausgesetzt wurden, mit geeigneten Kontrollzellen. Ein wesentlicher Aspekt dieser Experimente ist eine gründliche Auswahl und Planung geeigneter Kontrollen, um Artefakte auszuschließen. Zur Verdeutlichung des experimentellen Designs dient folgende Darstellung.

Parabelflugexperimente

1. Parabelflug (F0g)
2. Influgkontrolle: Zentrifugation bei 1g (FK)

Kontrollexperimente im Labor

3. Zentrifugation bei 1,8g (1,8g)
4. Dehnung (D)
5. Dehnungskontrolle (DK)

Durch den kontinuierlichen Wechsel der Schwerkraftbedingungen während eines Parabelfluges (0g und 1,8g) wurde die Durchführung einer Influgkontrolle durch die Zentrifugation von primären bovinen Osteoblasten bei 1g während der Schwerelosigkeitsphase notwendig. Um reine Effekte einer erhöhten Beschleunigung auf 1,8g ausschließen zu können, wurde zusätzlich eine Kontrollzentrifugation bei 1,8g im Labor durchgeführt. Zum Vergleich einer mechanischen Entlastung mit einer mechanischen Bela-

stung im physiologischen Bereich diente ein Dehnungsexperiment. Alle Experimente wurden im wesentlichen unter denselben Bedingungen bezüglich der Zellkultur, der verwendeten Medien und der Temperatur durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.3). Somit war es möglich, detektierte Genexpressionsunterschiede den jeweiligen experimentellen Bedingungen zuzuordnen.

Bei der Analyse der Differential Displays lag der Schwerpunkt auf dem Vergleich der Parabelflugprobe (F0g) mit der Influgkontrolle (FK). Diese Proben unterschieden sich lediglich durch die schwerelose Phase, sodaß Unterschiede im Bandenmuster eindeutig den experimentellen Bedingungen zuzuordnen gewesen wären. Zwar konnte bei der Display-Analyse ein Unterschied detektiert werden. Dabei indizierte eine zusätzlich auftretende Bande (Fragment Nr. 4, s. Abb. 3.2.3-IV) in der Parabelflugprobe die mögliche Überexpression eines Genes. Da jedoch die Bande in sämtlichen Laborproben (1,8g, D und DK) ebenso als deutliches Signal auftrat, ist dies vermutlich keine Auswirkung der Schwerelosigkeit, sondern als methodisches Artefakt anzusehen.

Die vorliegenden Ergebnisse aus dem Differential Display ergaben somit keine Hinweise auf eine veränderte Genexpression durch die schwerelose Phase während eines Parabelflugs. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß bei einer Durchführung der übrigen PCR-Reaktionen mit weiteren Primerkombinationen eine differentielle Genexpression durch Schwerelosigkeit entdeckt wird.

Des weiteren konnten keine Unterschiede im Bandenmuster zwischen der Dehnungsprobe (D) und der Dehnungskontrolle (DK) detektiert werden. Dies überrascht insofern, als in Experimenten unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe der Differential Display Methode eine differentielle Genexpression in primären bovinen Osteoblasten nach mechanischer Belastung im physiologischen Bereich gezeigt werden konnte (*Tenbosch, 1999*). Verschiedene Ursachen sind hierfür denkbar: Zum einen wurden in der Arbeit von Ten-

bosch primäre bovine Osteoblasten mit der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine einem anderen Stimulus ausgesetzt (2 mal 30 Zyklen bei 4000 μ strain und 1 Hz). Zum anderen erfolgte die Zellysierung und somit die Genanalyse erst 24 h nach dem zweiten Dehnungsreiz – also deutlich später als in der vorliegenden Arbeit (bei der die Zellysierung schon nach 3 Stunden erfolgte). Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit, wie bereits oben erwähnt, keine vollständige Differential Display Analyse durchgeführt, so daß nicht alle Gene erfaßt werden konnten. Zukünftige Untersuchungen sollen klären, welche Faktoren für diesen Sachverhalt verantwortlich sind.

Beim Vergleich der 5 Proben (F0g, FK, 1,8g, D und DK) konnten weitere acht differierende Fragmente im Bandenmuster entdeckt werden.

Auffällig war eine Gruppe von 5 cDNA-Fragmenten, die auf eine differentielle Genexpression zwischen den Flugproben (F0g, FK) und Laborproben (1,8g, D, DK) hinweist (siehe Abb. 3.2.3-V-VII). Fragmente Nr. 5, 6 und 7 deuten auf eine Suppression durch Flugbedingungen hin, während Fragment Nr. 8 und Nr. 9 eine Aktivierung andeuten. Lediglich die Fragmente Nr. 7, 8 und 9 konnten mit der Reverse Northern Analyse bestätigt werden.

Somit scheinen Flugbedingungen - und nicht ursächlich die Schwerelosigkeitsphase - eine Veränderung der Genexpression zu bewirken. Als mögliche Ursachen dieser Veränderungen sind Druckverhältnisse und Vibrationen während des Fluges denkbar.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich in ersten Parabelflugexperimenten mit primären bovinen Osteoblasten, die von unserer Arbeitsgruppe vorgenommen wurden. Im Unterschied zu der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Genanalyse 48 Stunden nach Beginn der schwerelosen Bedingungen durchgeführt. Hierbei konnte ein Hitzeschockprotein der 70 kDa Familie per Differential Display Analyse identifiziert werden, welches eine Überexpression in der Parabelflugprobe im Vergleich zu einer Bodenkontrolle zeigte (*persönliche Mitteilung Jochen Tenbosch, Experimentelle Orthopä-*

die und Biomechanik, Universität Marburg). Jedoch wurde bei diesem Experiment keine Influgkontrolle durchgeführt und somit war es nicht möglich, die differentielle Genexpression ursächlich zuzuordnen.

Tjandrawinata et al konnten in einer Simulation der Vibrationen eines Space Shuttle Startvorganges mit osteoblastenähnlichen Zellen zeigen, daß die mRNA Expression in Osteoblasten beeinflusst wird. Innerhalb von dreißig Minuten wurden *c-fos* und *c-myc* induziert, während Osteocalcin und TGF- β nach 3 Stunden supprimiert wurden (Tjandrawinata et al, 1997).

Während eines Parabelfluges treten ebenfalls Vibrationen am Flugzeugsrumpf auf, die bei Zeitauflösungen von Zehntelsekunden zu Beschleunigungen um 0,3g führen. Folgende Abbildung zeigt die Aufzeichnung solcher Vibrationen an Bord eines Airbus A300 (Abb. 4.2-1).

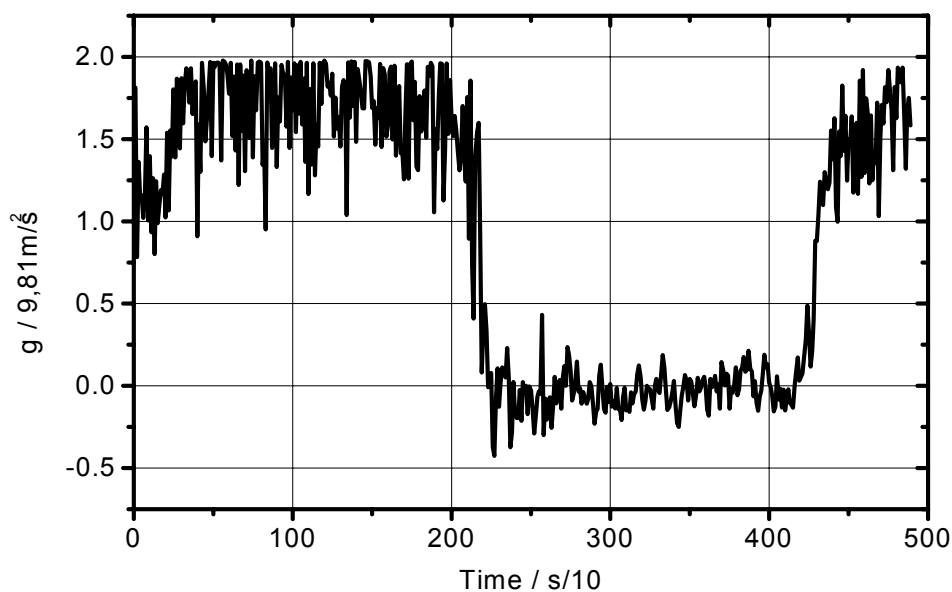


Abbildung 4.2-1 Darstellung der auftretenden Vibrationen während eines Parabelfluges

Die Differential Display Analyse ergab weiterhin drei differierende Banden in der 1,8g-Probe (Fragmente Nr. 1, 2 und 3, s. Abb. 3.2.3-I-III). Die isolierten und klonierten cDNA-Fragmente wurden per Reverse Northern Analyse überprüft, wobei lediglich Fragment Nr. 1 bestätigt werden konnte.

Eine Bewertung der anderen Fragmente war aufgrund mangelnder Signale nicht möglich.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Hypergravitation Auswirkungen auf die Genexpression in verschiedenen Zellarten hat. Bisher wurden hauptsächlich sehr hohe Beschleunigungen von 35g bis 900g untersucht (*Nose und Shibamura, 1994*). Aber auch die Simulation des Beschleunigungsprofils eines Space Shuttle Starts mit einer Beschleunigung auf maximal 3g resultierte in einer Veränderung der mRNA-Level für *c-fos* und Osteocalcin in Osteoblastenkulturen nach 30 Minuten verglichen mit Kontrollen (*Fitzgerald und Hughes-Fulford, 1996*). In Experimenten in unserem Labor konnte gezeigt werden, daß auch der Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine in Osteoblasten durch den kurzfristigen Einfluß von 11g für 3 Minuten verändert wird (*persönliche Mitteilung A. Guntermann, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Universität Marburg*). Viele Signalwege werden durch Veränderungen des Phosphorylierungsmusters aktiviert, die wiederum die Genexpression beeinflussen können.

Hinweise auf eine differentielle Genexpression ergab nur die rein intermittierende Beschleunigung auf 1,8g im Laborexperiment. Auch die Flugproben waren Phasen von 1,8g ausgesetzt, hier konnten jedoch entsprechende Veränderungen im Bandenmuster nicht gezeigt werden. Denkbar wäre eine gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Stimuli Schwerelosigkeit, Hypergravitation, sowie weiterer Bedingungen wie Vibrationen und Druckschwankungen. Aus dieser Argumentation ergibt sich eine Limitierung der Parabelflugexperimente.

Eine Beobachtung der durchgeführten Differential Display Analyse war, daß keine differentielle Genexpression detektiert werden konnte, die auf die Einwirkung von Schwerelosigkeit zurückzuführen ist. Zum einen könnte der Reiz mit 30 mal 25 Sekunden bei 0g zu gering sein, um einen Effekt auf die Genexpression auszuüben. Ein Indiz für diese Annahme sind beispielsweise Echtzeit-Messungen der intrazellulären Calciumdynamik in Osteoblastenkulturen während eines Parabelflugs, die von unserer

Arbeitsgruppe vorgenommen wurden. Diese ergaben keine signifikanten Veränderungen der Calciumdynamik während der Schwerelosigkeitsphase (*pers. Mitteilung D.B. Jones, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Universität Marburg*). Eine kürzlich in unserem Labor durchgeführte Untersuchung konnte zeigen, daß Osteoblasten mit mindestens 110nN mechanisch stimuliert werden müssen (also einem Reiz, der um einen Faktor um das 10^5 - bis 10^8 -fache über dem liegt, der beim Übergang von 1g auf 0g auf die einzelne Zelle wirkt), damit es zu einer Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern kommt (*Struckmeier et al, 2001*).

Zum anderen könnte die kontinuierliche Aufeinanderfolge von schwerelosen Phasen und Phasen erhöhter Beschleunigung die zelluläre Reaktion beeinflussen. So konnten z.B. Guignandon et al bei Untersuchungen bezüglich der Morphologie von Osteoarkomzellen (ROS17/2.8) Veränderungen der Zellgröße und reorganisatorische Prozesse bei der Assoziation von Fokuspunkten beobachten. Diese wurden interpretiert als Auswirkungen der wechselnden Schwerkräftsbedingungen, die während eines Parabellfluges auftreten (*Guignandon et al, 1995; 1997*).

Daten zur veränderten Genexpression aus Parabellflugexperimenten existieren bisher nicht. In dieser Arbeit wurde erstmals versucht, die Auswirkungen von Schwerelosigkeit während eines Parabellfluges auf die differentielle Genexpression in primären bovinen Osteoblasten zu untersuchen. Hierbei stand die Betrachtung früher Geninduktionen (z. B. Transkriptionsfaktoren) im Mittelpunkt, wobei durch die Wahl der Methode auch bislang nicht bekannte Gene hätten erfaßt werden können.

Die nach Abschluß dieser Arbeit entstandene Frage, ob Parabellflüge ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Auswirkung von Schwerelosigkeit auf die Genexpression in Osteoblastenkulturen darstellt, läßt sich letztendlich erst dann klären, wenn alle Differential Display-Reaktionen durchgeführt sind. Dies soll Gegenstand künftiger Arbeiten sein.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Differential-Display Technik grundsätzlich in der Lage, sehr sensitiv Genexpressionsunterschiede in Osteoblastenkulturen zu entdecken, die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen unterworfen werden.

Die diesbezüglich gewonnenen Informationen sollen in Zukunft dazu verwendet werden, ein analoges Experiment möglichst an Bord eines Space Shuttles oder in Satellitenexperimenten durchzuführen, um den Einfluß langfristig einwirkender Schwerelosigkeit zu untersuchen. Bei permanenter Schwerelosigkeit – ohne störenden Einfluß anderer Gravitationsreize – wurden bereits Untersuchungen zur Genexpression unternommen. Zum Beispiel wurden MG-63 Osteosarkomzellen 10 Tage unter schwerelosen Bedingungen kultiviert (Foton 10 Satellit) und eine Verminderung der mRNA Expression für Kollagen Typ I, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin nach hormoneller Stimulation nachgewiesen (*Carmeliet et al, 1997*). Des weiteren wurde ein Anstieg der mRNA-Level für Prostaglandin G/H Synthase und Interleukin-6 in Rattenosteoblasten nach 5 Tagen in einem Space Shuttle Flug von Kumei beschrieben (*Kumei et al, 1996*). Für das Verständnis veränderter zellulärer Vorgänge in Osteoblasten, die der Schwerelosigkeit ausgesetzt sind, wäre jedoch eine umfassende vergleichende Genexpressionsanalyse hilfreich.

5. Zusammenfassung

Knochen als dynamisches Gewebe unterliegt ständiger Umbauvorgänge unter hormoneller Kontrolle und körperlicher Belastung. Während Osteoblasten durch ihre Synthese von Matrixproteinen neue Knochensubstanz bilden, wird im gleichen Zuge Knochensubstanz durch die Aktivität von Osteoklasten abgebaut. Ein Faktor bei der Einstellung der Balance von Synthese und Abbau ist eine mechanische Belastung des Knochens. Bei Einwirkung von Schwerelosigkeit, einer Form der mechanischen Entlastung, wurden unter anderem Veränderungen der Knochendichte und der periostalen Knochensynthese nachgewiesen. Experimente in vivo und in vitro weisen auf Veränderungen der Genexpression in Knochengewebe unter schwerelosen Bedingungen hin, eine umfassende Genanalyse ist bisher jedoch nicht durchgeführt worden.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen kurzer Phasen von Schwerelosigkeit, erzeugt durch einen Parabelflug, auf die Genexpression in primären bovinen Osteoblasten untersucht. Das Experiment wurde 1996 in einer von der DLR und der ESA unterstützten Kampagne durchgeführt, die von Novespace und CNES organisiert wurde. Durch ein spezielles Flugmanöver, den Flug einer Parabel, befindet sich das Flugzeug für eine begrenzte Zeit von 25 Sekunden in Schwerelosigkeit. Die Flugdauer von 2,5 Stunden beinhaltet 2 Gruppen mit jeweils 15 Parabeln. Ein Parabelflugmanöver dauert circa 65 Sekunden und beinhaltet 3 Phasen: für eine Dauer von 20 Sekunden steigt die Beschleunigung auf 1,8g, es folgen 25 Sekunden bei 0g (die Phase der Schwerelosigkeit), an die sich wiederum eine Phase von 1,8g für 20 Sekunden anschließt.

Neben der schwerelosen Phase sind auch Auswirkungen der vermehrten Beschleunigung auf 1,8g, aber auch Effekte durch Flugbedingungen wie Druckschwankungen und Vibrationen denkbar. Es wurden daher zusätzliche Kontrollexperimente mit primären bovinen Osteoblasten durchgeführt. Als Influgkontrolle diente eine Zentrifugation auf 1g während der schwerelosen Phase. Zusätzlich wurden im Labor Experimente mit einer isolier-

ten Beschleunigung auf 1,8g und einer mechanischen Belastung in Form von Zelldehnungsexperimenten durchgeführt.

Die Analyse der Genexpression erfolgte mit der Differential Display Methode, die in der vorliegenden Arbeit mit 25 % aller möglichen Primerkombinationen durchgeführt wurde. Dabei wurden 9 cDNA-Fragmente isoliert, kloniert und sequenziert.

Auffällig war eine Gruppe von 5 cDNA-Fragmenten, die auf eine differentielle Genexpression zwischen den Flugproben (Parabelflug und Influgkontrolle) und den Laborproben (Beschleunigung auf 1,8g, Dehnung und Dehnungskontrolle) hinweist. Es scheinen die allgemeinen Flugbedingungen, die durch Vibrationen, Druckschwankungen und Veränderungen im g-Profil gekennzeichnet sind, eine Veränderung der Genexpression zu bewirken. Nach Sequenzierung der 5 cDNA-Fragmente konnte bei einem Fragment eine partielle Homologie über 50 Basenpaare zum humanen Differentiation-dependent gene 2 (DIF-2) in Sequenzdatenbanken nachgewiesen werden.

Ferner ergaben sich bei 3 cDNA-Fragmenten Anhaltspunkte für eine differentielle Genexpression bei einer isolierten Beschleunigung auf 1,8g. Die folgende Sequenzanalyse zeigte bei einem der 3 Fragmente über die gesamte Länge eine 93 %ige Übereinstimmung mit dem humanen Wnt 5A, dem eine Rolle bei rezeptorvermittelten interzellulären Signalvorgängen zugeschrieben wird.

Die vorliegenden Ergebnisse aus dem Differential Display ergaben jedoch keine Hinweise auf eine veränderte Genexpression in primären bovinen Osteoblasten, die auf die schwerelose Phase während des Parabelflugs zurückgeführt werden können. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß bei einer Durchführung der übrigen PCR-Reaktionen mit weiteren Primerkombinationen eine differentielle Genexpression entdeckt wird. Dies sollen zukünftige Experimente klären.

6. Literaturverzeichnis

1. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ
Function of osteocytes in bone.
J Cell Biochem. 1994; 55(3): 287-299
2. Al-Ajmi N, Braidman IP, Moore D
Effect of clinostat rotation on differentiation of embryonic bone in vitro.
Proc.5th Eur.Symp. on 'Life Sciences Research in Space' Archachon, France 1993; 1: 73-76
3. Basset CAL
Biological significance of piezoelectricity.
Calcif Tissue Res. 1968; 1: 252-272
4. Basset CAL, Becker RO
Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress.
Science 1962; 137: 1063-1064
5. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL
GenBank.
Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1; 28(1): 15-18
6. Bikle DD, Harris J, Halloran BP, Morey-Holton E
Altered skeletal pattern of gene expression in response to spaceflight and hindlimb elevation.
Am J Physiol. 1994; 267: 822-827
7. Bikle DD, Harris J, Halloran BP, Morey-Holton ER
Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor I.
J Bone Miner Res. 1994; 9: 1789-1796
8. Birnboim HC, Doley J
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 1979; 7: 1513-1522
9. Burger EH, Veldhuijzen JP
Influence of mechanical factors on bone formation, resorption and growth in vitro.
Hall. Boca Raton, FL, CRC Press 1993; B.K.(7): 37-56

10. Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C
Focal adhesions – transmembrane junctions between the extra-cellular-matrix and the cytoskeleton.
Annu Rev Cell Biol. 1988; 4: 487-525
11. Callard D, Lescure B, Mazzolini L
A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique.
Biotechniques 1994; 16: 1096-7, 1100
12. Carmeliet G, Nys G, Bouillon R
Microgravity reduces the differentiation of human osteoblastic MG-63 cells.
J Bone Miner Res. 1997; 12: 786-794
13. Carulli JP, Artinger M, Swain PM, Root CD, Chee L, Tulig C, Guerin J, Osborne M, Stein G, Lian J, Lomedico PT
High throughput analysis of differential gene expression.
J Cell Biochem. Suppl. 1988; 30-31: 286-296
14. Chomczynski P, Sacchi N
Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem. 1987; 162: 156-159
15. Cipriano LF
An overlooked gravisensing mechanism.
Physiologist 1991; 34: 72-75
16. Clark CC, Cohen I, Eichstetter I, Cannizzaro LA, McPherson JD, Wasmuth JJ, Iozzo RV
Molecular cloning of the human proto-oncogene Wnt-5A and mapping of the gene (WNT5A) to chromosome 3p14-p21.
Genomics 1993; 18(2): 249-260
17. Clark JM
Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases.
Nucleic Acids Res. 1988; 16: 9677-9686
18. Davidson RM, Tatakis DW, Auerbach AL
Multiple forms of mechanosensitive ion channels in osteoblast-like cells.
Pflugers Arch. 1990; 416: 646-651

19. Dodds RA, All N, Pead MJ, Lanyon LE
Early loading-related changes in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat fibulae in vitro.
J Bone Miner Res. 1993; 8: 261-267
20. Doty SB
Morphological evidence of gap junctions between bone cells.
Calcif Tissue Int. 1981; 33: 509-512
21. Duncan R, Misler S
Voltage-activated and stretch-activated Ca^{2+} conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR 106).
FEBS Lett. 1989; 251: 17-21
22. Duncan RL, Turner CH
Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain.
Calcif Tissue Int. 1995; 57: 344-358
23. Federman M, Nichols CF
Bone cell cilia, vestigial or functional organelles?
Calcif Tissue Res. 1974; 17: 81-85
24. Feinberg AP, Vogelstein B
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal Biochem. 1983; 132: 6-13
25. Fitzgerald J, Hughes-Fulford M
Gravitational loading of a simulated launch alters mRNA expression in osteoblasts.
Exp Cell Res. 1996; 228: 168-171
26. Frost HM
The mechanostat: A proposed pathogenic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and non-mechanical agents.
Bone 1987; 2: 73-85
27. Golz R, Thurm U
Cytoskeleton-membrane interactions in the cnidocil complex of hydrozoan nematocytes.
Cell Tissue Res. 1991; 263: 573-583

28. Guharay R, Sachs F
Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle.
J Physiol. 1984; 352: 685-701
29. Guignandon A, Genty C, Vico L, Lafage-Proust M-H, Palle S, Alexandre C
Demonstration of feasibility of automated osteoblastic line culture in space flight.
Bone 1997; 20: 109-116
30. Guignandon A, Usson Y, Laroche N, Lafage-Proust MH, Sabido O, Alexandre C, Vico L
Effects of intermittent or continuous gravitational stresses on cell-matrix adhesion: quantitative analysis of focal contacts in osteoblastic ROS 17/2.8 cells.
Exp Cell Res. 1997; 236: 66-75
31. Guignandon A, Vico L, Alexandre C, Lafage-Proust MH
Shape changes of osteoblastic cells under gravitational variations during parabolic flight –relationship with PGE2 synthesis. Cell Struct Funct. 1995; 20: 369-375
32. Halloran BP, Bikle DD, Wronski TJ, Globus RK, Levens MJ, Morey-Holton E
The role of 1,25-dihydroxyvitamin D in the inhibition of bone formation induced by skeletal unloading.
Endocrinology 1986; 118: 948-954
33. Hansen M, Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ
A role for phospholipase C activity but not ryanodine receptors in the initiation and propagation of intercellular calcium waves.
J Cell Sci. 1995; 108 (Pt 7): 2583-2590
34. Harell A, Dekel S, Binderman I
Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells.
Calcif Tissue Res. 1977; 22 Suppl.: 202-207
35. Harrigan TP, Hamilton JJ
Bone strain sensation via transmembrane potential changes in surface osteoblasts: loading rate and microstructural implications.
J Biomech. 1993; 26: 183-200
36. Hughes-Fulford M, Lewis ML
Effects of microgravity on osteoblast growth activation.
Exp Cell Res. 1996; 224: 103-109

-
37. Hynes RO
Integrins – a family of cell-surface receptors.
Cell 1987; 48: 549-554
 38. Ingber D
Integrins as mechanochemical transducers.
Curr Opin Cell Biol. 1991; 3: 841-848
 39. Ingber DE, Folkman J
Tension and compression as basic determinants of cell form and function: utilization of a cellular tensegrity mechanism.
In: Cell Shape: Determinants, Regulation and Regulatory Role, edited by W. Stein and F. Bonner. Academic Press, Orlando 1989; 3-31
 40. Johnson DL, McAllister TN, Frangos JA
Fluid-flow stimulates rapid and continuous release of nitric-oxide in osteoblasts.
Am J Physiol. 1996 Jul;271(1 Pt 1):E205-8.
 41. Jones D, Leivseth G, Tenbosch J
Mechano-reception in osteoblast-like cells.
Biochem Cell Biol. 1995; 73: 525-534
 42. Jones DB, Leivseth G
Strain transduction in non-excitable cells.
In Biomechanics of Active Movement and Division of Cells. Ed. N Akkas. NATO Advanced Study Workshop Series. Springer Verlag 1994; Vol. H84: 453-458
 43. Jones DB, Leivseth G, Sawada Y, van der Sloten J, Bingmann D
Application of homogenous, defined strains to cell cultures.
In Biomechanics of cells. Edited by F Lyall and AJ El Haj, Cambridge University Press, Cambridge 1993; 197-219.
 44. Jones DB, Nolte H, Scholuebbbers J-G, Turner E, Veltel D
Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells.
Biomaterials 1991; 12: 101-110
 45. Jones DB, Scholuebbbers JG
Mechanical stress transduction in OB-like cells. Fortschritte der Osteologie in Diagnostik und Therapie (ed. by FHW Heuck) 1988; 382-389. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

-
46. Jones, DB, Bingmann D
How do osteoblasts respond to mechanical stimulation.
Cells and Materials 1991; 1: 329-340
 47. Kumei Y, Shimogawa H, Katano H, Akiyama H, Hirano M, Mukai C, Nagaoka S, Whitson PA, Sams CF
Spaceflight modulates insulin-like growth factor binding proteins and glucocorticoid receptor in osteoblasts.
J Appl Physiol. 1998; 85: 139-147
 48. Kumei Y, Shimokawa H, Katano H, Hara E, Akiyama H, Hirano M, Mukai C, Nagaoka S, Whitson PA, Sams CF
Microgravity induces prostaglandin E2 and interleukin-6 production in normal rat osteoblasts: role in bone demineralization.
J Biotechnol. 1996; 47: 313-324
 49. Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ, Chow JW
Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation.
Am J Physiol. 1995; 268: E318-E327
 50. Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB
Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells.
Cancer Res. 1992; 52: 6966-6968
 51. Liang P, Pardee AB
Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.
Science 1992; 257: 967-971
 52. Lindl T, Bauer J
Zell- und Gewebekultur.
Gustav Fischer Verlag 1994; Stuttgart-Jena-New York
 53. Mandel M, Higa A
Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.
J Mol Biol. 1970; 53: 159-162
 54. Marie PJ, Jones D, Vico L, Zallone A, Hinsenkamp M, Cancedda R
Osteobiology, strain, and microgravity: part I. Studies at the cellular level.
Calcif Tissue Int. 2000 Jul; 67(1): 2-9. Review.

-
55. Mason DJ, Suva LJ, Genever PG/ML, Patton AJ, Steuckle S, Hillam RA, Skerry TM
Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: A role for excitatory acids as osteotropic agents?
Bone 1997; 20: 199-205
 56. Matz MV, Lukyanov SA
Different strategies of differential display: areas of application.
Nucleic Acids Res. 1998; 26: 5537-5543
 57. Morey ER, Baylink DJ
Inhibition of bone formation during space flight.
Science 1978; 201: 1138-1141
 58. Mou L, Miller H, Li J, Wang E, Chalifour L
Improvements to the differential display method for gene analysis.
Biochem Biophys Res Commun. 1994; 199: 564-569
 59. Nose K, Shibamura M
Induction of early response genes by hypergravity in cultured mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1).
Exp Cell Res. 1994; 211: 168-170
 60. Nusse R, Varmus HE
Wnt genes.
Cell 1992; 69: 1073-1087
 61. Parfitt AM
The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data.
Bone Histomorphometry (ed. by R.R. Recker), CRC Press, Boca Raton, FL. 1983; 143-222
 62. Pietzsch A, Buchler C, Aslanidis C, Schmitz G
Identification and characterization of a novel monocyte/macrophage differentiation-dependent gene that is responsive to lipopolysaccharide, ceramide, and lysophosphatidylcholine.
Biochem Biophys Res Commun. 1997; Jun 9, 235(1): 4-9
 63. Pitsillides AA, Rawlinson SC, Suswillo RF, Bourrin S, Zaman G, Lanyon LE
Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling?
FASEB J. 1995; 9: 1614-1622

-
64. Quin YX, Rubin CT, McLeod KJ
Nonlinear dependence of loading intensity and cycle number in the maintenance of bone mass and morphology.
J Orthop Res. 1998; 16: 482-489
 65. Raab-Cullen DM, Thiede MA, Petersen DN, Kimmel DB, Recker RR
Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression.
Calcif Tissue Int. 1994; 55: 473-478
 66. Rambaut PC, Johnston RS
Prolonged weightlessness and calcium loss in man.
Acta Astronautica 1979; 6: 1113-1122
 67. Rodan GA
Mechanical loading, estrogen deficiency, and the coupling of bone formation to bone resorption.
J Bone Miner Res. 1991; 6: 527-530
 68. Rodan GA
Coupling of bone resorption and formation during bone remodeling.
Osteoporosis (ed. by R Marcus, D Feldman, J Kelsey), Academic Press, San Diego 1996; 289-299
 69. Rodan GA, Bourret LA, Harvey A, Mansi T
cAMP and cGMP: mediators of the mechanical effects on bone remodeling.
Science 1975; 189: 467-469
 70. Roux W
Der Kampf der Teile im Organismus.
Biol. Centralbl. 1881;1: 241-251
 71. Roux W.
Der Kampf der Teile im Organismus.
Engelmann, Leipzig 1881;
 72. Rubin CT, Lanyon LE
Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude.
Calcif Tissue Int. 1985; 37: 411-417
 73. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T
Molecular cloning, a laboratory manual, 2 edn.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989;

-
74. Satir P, Sleight MA
The physiology of cilia and mucociliary interactions.
Annu Rev Physiol. 1990; 52: 137-155
 75. Schatz A, Reitstetter I, Breigleb W, Linke-Hommes A
Ein Modell für den Einfluß der Schwerkraft auf biologische Vorgänge in einzelnen Zellen.
Spektrum der Wissenschaft 1993; Sept: 18-20
 76. Schirrmacher K, Schmitz I, Winterhager E, Traub O, Brümmer F, Jones DB, Bingmann D
Characterisation of gap junctions between osteoblast-like cells in culture.
Calcif Tissue Int. 1992; 51: 285-290
 77. Schmidt C, Pommerenke H, Durr F, Nebe B, Rychly J
Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins.
J Biol Chem. 1998; 273: 5081-5085
 78. Sheldal LC, Park M, Malbon CC, Moon RT
Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and frizzled homologs in a G-protein-dependent manner.
Curr Biol. 1999; 9(13): 695-698
 79. Sievers A
Gravity and the cytoskeleton.
ESA Life Sci Space Symp. 1993; CMB 10-01
 80. Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT
Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A.
Dev Biol. 1997; 182: 114-120
 81. Smith EL, Gilligan C
Exercise and bone mass.
In: De Luca, HF, Mazess, R (eds) Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment. Elsevier Science, New York 1990; 285-293
 82. Somjen D, Binderman I, Berger E, Harell A
Bone remodeling induced by physical stress is prostaglandin E₂ mediated.
Biochim Biophys Acta. 1980 Jan 3; 627(1): 91-100

-
83. Spengler DM, Morey ER, Carter DR, Turner RT, Baylink DJ
Effects of spaceflight on structural and material strength of growing bone.
Proc Soc Exp Biol Med. 1983; 174: 224-228
 84. Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M
Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation.
Physiol Rev. 1996; 76: 593-629
 85. Struckmeier J, Klopp E, Born M, Hofmann M, Curze S, Rink D, Jones DB, Ecke S, Butt H-J
Quantification of the mechanical forces required to induce intracellular free Calcium increases in primary bovine osteoblasts.
2001; Ref Type: Unpublished work
 86. Tenbosch J
Untersuchungen zum Einfluß mechanischer Deformationen auf Osteoblasten.
Diss, Frankfurt 1999;
 87. Tilton FE, Degioanni JJC, Schneider VS
Long-term follow-up of Skylab bone demineralization.
Aviat Space Environ Med. 1980; 51: 1209-1213
 88. Tjandrawinata RR, Vincent VL, Hughes-Fulford M
Vibrational force alters mRNA expression in osteoblasts.
FASEB J. 1997; 11: 493-497
 89. Vandenburg HH, Hatfaludy S, Karlisch P, Shansky J
Skeletal muscle growth is stimulated by intermittent stretch-relaxation in tissue culture.
Am J Physiol. 1989; 256: 674-682
 90. Vico L, Bourrin S, Genty C, Palle S, Alexandre C
Histomorphometric analysis of cancellous bone from COSMOS 2044 rats.
J Appl Physiol. 1993; 75: 2203-2208
 91. Vico L, Chappard D, Palle S, Bakulin AV, Alexandre C
Trabecular bone remodeling after seven days of weightlessness exposure (Biocosmos 1667).
Am J Physiol. 1988; 255: R243-247

-
92. Watson PA, Giger KE, Kempinski AM
Type-I and type-VIII adenylyl cyclases constitute a family whose activation is coupled to cellular-deformation through the action of calcium-calmodulin.
Biochem Cell Biol. 1995; 73: 367-372
 93. Wehner R, Gehring W
Zoologie, 23 edn.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995;
 94. Wolff J
Das Gesetz der Transformation der Knochen.
Hirschwald Berlin 1892;
 95. Wronski TJ, Morey E R
Effect of spaceflight on periosteal bone formation in rats.
Am J Physiol. 1983; 244: R305-R309
 96. Wronski TJ, Morey-Holton ER
Skeletal response to simulated weightlessness: a comparison of suspension techniques.
Aviat Space Environ Med. 1986; 58: 63-68
 97. Wronski TJ, Morey-Holton ER, Doty SB, Maese AC, Walsh CC
Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight.
Am J Physiol. 1987; 252: R252-255
 98. Ypey DL, Weidema AF, Hold KM, Van der Laarse A, Ravesloot JH, van der Plas A, Nijweide PJ
Voltage, calcium, and stretch activated ionic channels and intracellular calcium in bone cells.
J Bone Miner Res. 1992; 7 Suppl 2: S377-387
 99. Zerath E, Novikov V, Leblanc A, Bakulin A, Oganov V, Grynpas M
Effects of spaceflight on bone mineralization in the rhesus monkey.
J Appl Physiol. 1996; 81: 194-200
 100. Zhang H, Zhang R, Liang P
Differential screening of gene expression difference enriched by differential display.
Nucleic Acids Res. 1996; 24: 2454-2455

-
101. Zhang R, Supowit SC, Klein GL, Lu Z, Christensen MD, Lozano R, Simmons DJ
Rat tail suspension reduces messenger RNA level for growth factors and osteopontin and decreases the osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells.
J Bone Miner Res. 1995; 10: 415-423

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

(v/v)	Volume over volume (Volumen/Volumen-Verhältnis)
(w/v)	Weight over volume (Gewicht/Volumen-Verhältnis)
Ac	Acetat
As	Aminosäure
bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre RNA-Abschrift
cGMP	Zyklo-3',5'-Guanylmophosphat
CNES	Centre National D'Etudes Spatiales
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLR	(Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V.)
DMEM	Dulbecco`s Modifikation von Eagle`s Medium
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene diamino tetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
ERK	extracellular regulated kinase
ESA	European Space Agency
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
IGF	insulin like growth factor
IGF BP	insulin like growth factor binding protein
kb	Kilobasen
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
OD _x	Optische Dichte bei x nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSC	Sodiumchloride-sodiumcitrate (Natriumchlorid-Natriumcitrat)
SSPE	Sodiumchloride-sodiumphosphate-EDTA (Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA)
Str	Strain, 1 Strain (ϵ) entspricht 100% Längenänderung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit)
ÜN-Kultur	Über-Nacht-Kultur
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galaktosid

7.2. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren:

In Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bertalanffy, Bien, Daut, Fruhstorfer, Gemsa, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Grzeschik, Happle, Hasilik, Hilgermann, Hoffmann, Huffmann, Joseph, Kälble, Kern, Klenk, Klose, Koolman, Lang, Lennartz, Lorenz, Maisch, Mennel, Moosdorf, Mueller, Oertel, Radsak, Remschmidt, Rothmund, Schäfer, Schachtschabel, Seitz, Slenczka, Steiniger, Sturm, Vohland, Voigt, Walter, Wagner, Weihe, Wesemann, v. Wichert

In Göppingen:

Allmendinger, Eisele, Milewski, Giesler, Hanel, Hettenbach, Kurrle, Schaudig, Sigel, Spranger, Ulrich, Wölfel

7.3. Danksagung

Für die Möglichkeit der Promotion und Überlassung des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. D.B. Jones, Leiter der Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik des Medizinischen Zentrums für Operative Medizin der Philipps-Universität Marburg.

Für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Dr. J. Tenbosch.

Mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung während des experimentellen Teils dieser Arbeit gilt allen Mitarbeitern und MTA der Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, insbesondere Frau M. Kratz, Herrn W. Tan und Herrn T. Pohl.

7.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel *Die Auswirkung von Schwerelosigkeit auf die Genexpression in primären bovinen Osteoblasten* im Medizinischen Zentrum für Operative Medizin, Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter Leitung von Prof. Dr. D.B. Jones mit Unterstützung durch Dr. J. Tenbosch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 23.05.2002